

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



Corso di Dottorato di Ricerca in

SCIENZE PEDIATRICHE

Curriculum: PATOLOGIA FETO-PERINATALE E PEDIATRICA

XXXII Ciclo

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

Tutor:

Chiar.mo Prof. Ezio Fulcheri

Candidata:

Dott.ssa Francesca Buffelli

PROGETTO: *Vasculogenesi, anomalie di crescita vascolari della placenta e cardiopatie congenite: uno studio sperimentale, multidisciplinare e multicentrico volto ad individuare una correlazione ad oggi non nota.*

Sommario

Abstract.....	3
1. Introduzione	6
1.1 Le cardiopatie congenite (CC)	6
1.2 La placenta.....	14
1.3 Embriologia placentare	24
1.4 Embriologia Cardiaca.....	29
1.5 Circolazione utero-placentare e fetale.....	33
1.6 La Letteratura fino ad oggi.....	35
1.7 Possibili correlazioni tra CC e Anomalie Placentari (AP): studi preliminari	39
1.8 Gli obiettivi del nostro studio	63
2. Materiali e Metodi	64
2.1 Caratteristiche dello studio	64
2.2 Criteri di inclusione ed esclusione.....	64
2.3 Modalità di diagnosi.....	64
2.4 Modalità di classificazione dei feti con CC.....	74
2.5 Dati utilizzati e Modalità di raccolta dati.....	74
2.6 Descrizione dei dati	74
2.7 Tipo di analisi statistica.....	75
3. Risultati e discussioni.....	78
3.1 Generalità	78
3.2 Anomalo Inserimento del Cordone (AIC) e CC	83
3.3 Arteria Ombelicale Singola (AOS) e CC	86
3.4 Edema del Cordone e CC	88
3.5 Peso Placentare alla nascita e CC.....	90
3.6 Intrauterine Growth Restriction (IUGR) e CC	93
3.7 Genere Sessuale e CC	95
3.8 Anomalie Extracardiache Associate e CC	97
3.9 Interventi neonatali e CC	100
4. Conclusioni	103
5. Bibliografia	115

ABSTRACT

Introduzione: Le Cardiopatie Congenite (CC), sono le anomalie congenite più frequenti alla nascita, con un'incidenza di 1 su 100 nati vivi. La placenta è l'organo fetale più complesso, in grado di garantire lo sviluppo e la crescita fetale durante la gravidanza. Sebbene lo sviluppo della placenta e del cuore avvenga in parallelo, il rapporto tra questi due organi risulta sconosciuto e trattato solo di recente.

Nell'ambito della patologia feto-perinatale e pediatrica, particolare rilevanza assumono le anomalie o le franche malformazioni congenite del sistema cardio-vascolare.

Il progetto di ricerca stabilito e pensato in origine per lo svolgimento di questo Corso di Dottorato era volto ad indagare se patologie cardiache - o altre malformazioni vascolari - potessero essere correlabili, con meccanismo di associazione o di conseguenza (causalità), con quadri vascolari anomali placentari; in altre parole, lo scopo della ricerca era quello di dimostrare la sussistenza di una ipotetica correlazione tra vasculopatie placentari e malformazioni cardiache fetali, così come avviene in altri ambiti già noti della patologia feto-perinatale.

Ulteriore interesse per tale progetto nasceva, poi, dalla constatazione del fatto che in letteratura, sul tema dell'istologia patologica dei vasi e più in genere del sistema circolatorio nelle sue varie componenti, sono presenti esclusivamente studi e segnalazioni sporadici di singoli casi, per lo più riguardanti casi patologici o, comunque, fuori della norma.

La diagnostica istopatologica in ambito feto-perinatale - non infrequentemente - richiede di effettuare osservazioni sulle caratteristiche strutturali dei vasi, siano essi arteriosi che venosi.

Si tratta, infatti, di porre diagnosi di svariate condizioni displastiche (angio-displastiche), distrofiche (angio-distrofiche), malformative o teratomatose nell'ambito della patologia cardio-vascolare, uno dei temi di maggiore attualità e più sensibili.

In tale diagnostica, vengono prese in considerazione la distribuzione dei vasi, le caratteristiche di ramificazione ed ancora le caratteristiche strutturali della parete.

Le caratteristiche strutturali della parete sono per lo più basate su osservazioni istologiche (isto-morfologiche ed isto-architetture) e citologiche (cito-struttura delle varie componenti dei vasi). Molto più raramente viene effettuata una valutazione morfo-funzionale correlando le caratteristiche citologiche ed isto-architetture con le proprietà funzionali delle singole componenti tessutali.

Inoltre, al di là delle caratteristiche strutturali della rete vascolare arteriosa o venosa fetale, non si possiedono dati corretti sulle singole componenti strutturali delle cellule che costituiscono la parete dei vasi. Le indagini pubblicate sono, infatti, per lo più condotte studiando solo alcune componenti del citoscheletro o alcuni anticorpi mirati a proteine o a parti di proteine contrattili della parete dei vasi, ma difficilmente è dato reperire un quadro globale in cui siano messi a confronto tutti i marcatori della componente muscolare della parete dei vasi attualmente disponibili sul mercato.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze non esiste, poi, uno studio approfondito che monitori lo sviluppo vascolare del feto a seconda delle varie settimane gestazionali e che, pertanto, sia in grado di fornire uno schema sulle caratteristiche morfo-strutturali delle varie tipologie di vasi nei diversi segmenti e settori corporei.

Ciò premesso, appare evidente come un'alterazione precoce - nelle fasi dello sviluppo - della suddetta embriogenesi, possa rappresentare il substrato (scena formativa) su cui agiscono svariate cause, ad oggi non ancora dimostrate, di malformazioni cardiache.

Certamente uno sviluppo anomalo dei vasi placentari (anch'essi di derivazione vitellina) può rappresentare un segnale indicativo di altre anomalie instauratesi o instaurantesi sul sistema cardio-vascolare fetale. Come per gli altri organi, infatti, durante lo sviluppo, anche la formazione dei vasi nelle strutture coriali può essere suddivisa nei seguenti due processi, differenti per meccanismi e controlli coinvolti.

Dai risultati di questi studi si evince che, il fenotipo vascolare della placenta e del feto è completamente diverso. Questo risultato mette in discussione la correlazione fra le anomalie placentari e quelle fetale a patogenesi esclusivamente angiogenica.

È probabile quindi che l'associazione fra le anomalie di questi due organi trovi le basi in un'etiologia di tipo multifattoriale, nella quale la componente vascolare gioca comunque un ruolo di primaria importanza, ma non è in grado da sola di indurre la patogenesi di queste condizioni. Preso atto dei risultati ottenuti si è presa in considerazione una interruzione del profilo fenotipico tra i vasi placentari e fetali e per tale motivo la ricerca delle cellule endoteliali placentari non pare avere più senso, modulando la ricerca su altri aspetti.

Metodi: Abbiamo condotto uno studio osservazionale retrospettivo, includendo i pazienti nati esclusivamente presso l'ospedale G. Gaslini, tra gennaio 2014 e marzo 2018 con una diagnosi prenatale di CC e un'analisi anatomopatologica della placenta, per un totale di 151 pazienti.

I feti affetti da CC sono stati divisi in 5 categorie, basate sulla fisiologia cardiovascolare, come segue: (1) ventricolo singolo con ostruzione aortica, (2) ventricolo singolo con ostruzione polmonare, (3) due ventricoli emodinamicamente instabili, (4) trasposizione delle grandi arterie, (5) due ventricoli emodinamicamente stabili.

Per ogni paziente, sono stati considerati i seguenti dati: peso placentare assoluto, alterazioni macroscopiche e vascolari del cordone ombelicale, indice di massa corporea materna (BMI), genere, restrizione di crescita intrauterina fetale e neonatale (IUGR), anomalie extracardiache, procedura chirurgica o percutanea nel periodo neonatale.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test esatto di Fisher, con il quale abbiamo studiato il rapporto di dipendenza fra una specifica variabile e le CC; un $p < 0,05$ è stato ritenuto significativo per la dipendenza.

Risultati: Solo quattro variabili hanno mostrato una significatività scientifica: l'intervento neonatale ($p = 0,000008$), le anomalie associate extracardiache ($p = 0,012$), l'edema del cordone ombelicale ($p = 0,007$) e il genere ($p = 0,015$).

Nonostante avessimo riscontrato un'alta incidenza di inserimento anomalo del cordone ombelicale nelle placente di neonati cardiopatici, il risultato dell'analisi di Fisher non ha dimostrato alcuna dipendenza tra i gruppi CC e questa variabile ($p = 0,379$).

Conclusione: Dallo studio dei nostri risultati, non riteniamo che il peso della placenta possa predire la diagnosi di CC, come precedentemente riportato in letteratura.

Sulla base della nostra esperienza, non possiamo considerare l'inserimento anormale del cordone come un fattore ad alto rischio per CC. Pertanto, non riteniamo necessario ampliare la metodica di screening ecografico mediante l'analisi della modalità di inserimento del cordone.

Contrariamente, la presenza di edema del cordone ombelicale è risultata dipendente dalle CC quindi, potrebbe essere ritenuto un fattore di rischio per CC. Analogamente, anche il genere è risultato dipendente dalle CC, con una forte associazione fra il sesso maschile e le CC Mayor.

Per il futuro, riteniamo necessario implementare la ricerca con l'inserimento di un gruppo di controllo e con l'inclusione di altre variabili cliniche e strumentali del feto e della placenta.

1. Introduzione

1.1 Le cardiopatie congenite (CC)

Le Malformazioni Cardiache sono le più comuni anomalie di tipo congenito, con un'incidenza, in continua crescita [1] che varia dai 6 ai 13 casi su 1000 nati vivi/anno [2] rappresentata da un picco massimo in Asia (9, 3 su 1000 nati vivi) e uno minimo in Africa (1.9 su 1000 nati vivi) [3, 4]. Le cardiopatie congenite (CC), sono quattro volte più frequenti di tutte le aneuploidie e di tutte le anomalie del tubo neurale e sono tra le più comuni cause di mortalità fetale e neonatale, essendo responsabili del 20% dei nati morti, del 30% dei decessi neonatali globali e del 50% della mortalità infantile per malformazioni congenite [5]. Inoltre, sembrerebbe esserci una correlazione fra le CC e la morbidità a lungo termine del bambino; secondo recenti studi infatti, le CC sarebbero in grado di influenzare negativamente il neurosviluppo del paziente [6, 7, 8].

L'eziologia delle CC è eterogenea e complessa, pressoché sconosciuta nella maggior parte dei casi.

Circa il 10-15% delle malformazioni cardiache sono associate a sindromi cromosomiche [9, 10], di cui le più frequenti sono rappresentate da: la Sindrome di Down (trisomia 21) [11], la Sindrome di Edwards (trisomia 18), la Sindrome di Patau (trisomia 13), la Sindrome di Turner (monosomia X), la Sindrome Cat-eye (tetrasomia 22, contraddistinta dalla presenza di difetti oculari, auricolari, renali, cardiaci e da atresie anali)[12]. Un altro 20% circa delle cardiopatie sono associate a microanomalie cromosomiche, tra cui la più tipica è rappresentata dalla delezione 22q11.2 (Sindrome di George) [13]. Infine, circa 15-20% delle diagnosi di CC si sviluppa nel contesto di una Sindrome Monogenica, prevalentemente rappresenta dalla famiglia delle RASopatie (gruppo eterogeneo di patologie poli-malformative, definite da dismorfismi facciali, iposomia, anomalie cardiache e scheletriche e dall'aumentata suscettibilità tumorale) [14].

Cardiopatologia congenita	%
Canale atrioventricolare	70-80
Interruzione arco aortico	40-50
Truncus arterioso	40-45
Ventricolo destro a doppia uscita	35-40
Difetto interatriale	30-40
Tetralogia di Fallot	30-35
Coartazione aortica	23-25
Ritorno venoso polmonare anormale	20-23
Difetto interventricolare	18-25
Anomalia Ebstein	18-23
Stenosi polmonare	15-25
Stenosi aortica	15-20
Cuore sinistro ipoplasico	15-20
Atresia tricuspide	12-18
Trasposizione grandi arterie	10-12
Atresia polmonare a setto integro	8-12

Figura 1

I valori in percentuale, indicano la prevalenza delle Anomalie Extracardiache all'interno delle diverse Cardiopatie Congenite. *Immagine tratta da "le basi genetiche delle CC" Digillio, 2014.*

Solo in un 2% dei casi, l'eziologia è causata esclusivamente da fattori ambientali teratogeni, tipicamente rappresentati dal virus della Rosolia, dal Diabete Mellito (DM) materno, da alcuni farmaci come il Talidomide e il Litio, dall'alcool e dal fumo [15, 16].

In conclusione, la maggior parte delle CC, circa il 50%, è di origine sconosciuta e viene attribuita ad un'eziologia multifattoriale [17], caratterizzata dall'associazione di molteplici fattori ambientali e genetici; il meccanismo patogenetico sembrerebbe essere indotto da un'interazione complessa fra i fattori teratogeni e specifici geni bersaglio, regolatori dello sviluppo delle principali cellule progenitrici cardiache. Sono proprio questi gruppi di cellule primordiali a subire il danno dal quale deriverà la CC. Fra i più importanti bersagli dell'azione multifattoriale, riconosciamo le cellule campo cardiaco primario e secondario, quelle delle creste neurali e quelle dei cuscinetti endocardici. Il motivo per il quale l'eziologia delle cardiopatie è stata definita eterogenea è confermato dal fatto che la stessa mutazione, colpendo gruppi cellulari progenitori diversi, può portare allo stesso difetto congenito; ne è un esempio la Trasposizione delle Grandi Arterie (dTGA), nella quale la patogenesi può essere indotta sia da una distruzione delle cellule del campo secondario, che da un danno a carico della cresta neurale.

Essendo lo sviluppo embriologico cardiaco molto precoce, tutto ciò che potenzialmente è in grado di alterare il microambiente materno/fetale, soprattutto nelle prime otto settimane di gestazione, può influenzare negativamente lo sviluppo, non solo del cuore, ma di tutti gli organi fetali.

Considerando il ruolo fondamentale, ma non esclusivo, che la componente genetica ha nello sviluppo delle Cardiopatie, analizzeremo le diverse anomalie cardiache attraverso la classificazione morfogenetica [18] proposta da Edward Clark. Questa suddivisione, andando a raggruppare le Cardiopatie in 6 gruppi, permette di creare un collegamento tra causa, meccanismo patogenetico e tipo di malformazione che accumulano i diversi difetti congeniti.

1. Anomalie della migrazione del tessuto ecto-mesenchimale: comprende il gruppo di anomalie caratterizzate da una alterata migrazione della porzione anteriore del “secondo campo cardiaco”, da cui originano il segmento conotruncale, futuro tratto di efflusso, e il ventricolo destro. Rientrano in questo gruppo:

- Difetto Interventricolare Sottoartico di tipo 1, Infundibolare (DIV I)
- Ventricolo Destro a Doppia Uscita (DORV)
- Tetralogia di Fallot (TOF)
- Atresia Polmonare con Difetto Interventricolare (APDIV)
- Finestra Aorto-Polmonare

- Tronco Arterioso Comune
- Interruzione dell'Arco Aortico tipo B
- Doppio Arco Aortico
- Arco Aortico Destro

Nell'ambito di questo gruppo, la Tetralogia di Fallot, il Tronco Arterioso Comune, il Difetto Interventricolare Infundibolare e l'Interruzione dell'Arco Aortico vengono definite CC conotroncali. In molti pazienti con questo tipo di CC, sono state descritte numerose sindromi cromosomiche e monogeniche, fra le quali merita una menzione a parte la delezione del cromosoma 22q11, ovvero la sindrome di DiGeorge [19]. Tale sindrome è contraddistinta da molteplici malformazioni, la cui patogenesi trova le basi in un difetto a carico delle cellule della cresta neurale. Fra le principali anomalie che caratterizzano la sindrome di DiGeorge ricordiamo: dismorfismi facciali, ipoplasia timica, disfunzione paratiroidea e anomalie cardiache del tratto d'efflusso, quest'ultime sono più frequentemente rappresentate dalla Tetralogia di Fallot e dal Tronco Arterioso che, nel contesto di questa sindrome, sono spesso associate a difetti cardiaci aggiuntivi e peculiari, quali l'arteria succlavia sinistra o destra aberrante (a seconda della posizione dell'arco aortico), ipoplasia o assenza del setto infundibolare, assenza della valvola polmonare, discontinuità o ipoplasia delle arterie polmonari.

- 2. Anomalie del flusso ematico intracardiaco:** alterazioni a carico dello sviluppo dei setti o di malformazioni ostruttive a carico del cuore destro e sinistro, possono essere responsabili di modificazioni emodinamiche intracardiache e di alterazioni del rimodellamento cardiaco, a cui conseguono specifiche CC:
- Difetto Interventricolare Perimembranoso (DIV Perimembranoso)
 - Difetti del cuore sinistro: Valvola Aortica Bicuspidale, Stenosi Aortica Valvolare, Coartazione Aortica, Interruzione dell'Arco Aortico tipo A, Sindrome del Cuore Sinistro Ipoplasico, Atresia Aortica, Atresia Mitralica
 - Difetti del cuore destro: Valvola Polmonare Bicuspidale, Difetto Interatriale di tipo Ostium Secundum, Stenosi Polmonare Valvolare, Atresia Polmonare con Setto Interventricolare Intatto

Nel 20% dei pazienti con DIV perimembranoso vi sono associate anomalie extracardiache aggiuntive, le quali sembrano influenzare la gravità, descritta in termini di grandezza, del difetto stesso. Infatti: tanto più il difetto è ampio, tanto più spesso risulterà associato a quadri sindromici. Per quanto riguarda le alterazioni del cuore sinistro, la Sindrome di Jacobsen (delezione 11q23.3), caratterizzata da disfunzione del sistema nervoso con ritardo psicofisico e mentale, anomalie cardiache, renali, gastroenteriche ed ematologiche, è pressoché esclusiva del Cuore Sinistro Ipoplastico, mentre la Sindrome di Turner risulta più marcatamente rappresentata nel contesto della Coartazione Aortica. Per quanto riguarda le anomalie del cuore destro, nel 25% dei casi il Difetto Interatriale si presenta associato ad alterazioni extracardiache, mentre nella Stenosi Polmonare le anomalie genetiche più rappresentate sono le RASopatie, soprattutto la Sindrome di Noonan.

3. Anomalie della morte cellulare: rientrano in questo gruppo tutte le alterazioni a carico del fenomeno apoptotico delle cellule progenitrici del setto interventricolare muscolare e di parte del ventricolo destro:

- Difetto Interventricolare muscolare (DIV muscolare)
- Anomalia di Ebstein della valvola tricuspidale

Il DIV muscolare è, con ogni probabilità, la cardiopatia fetale e neonatale a più alta frequenza. Gli studi ecografici riportano un'incidenza superiore al 2% nei neonati e al 4% nei feti sani. L'associazione tra anomalie cromosomiche e DIV muscolare è pari a quella della popolazione generale, mentre l'anomalia di Ebstein della Tricuspidale presenta una correlazione, sia con patologie cromosomiche che monogeniche, nel 20% dei casi [20].

4. Anomalie della matrice extracellulare: Descrive un insieme di CC definite dall'alterazione del processo di sintesi o deposizione della matrice extracellulare all'interno dei cuscinetti endocardici, dai quali dovrebbero originare il setto interatriale, atrioventricolare, interventricolare, le valvole atrioventricolari e semilunari:

- Difetto Interatriale Ostium Primum
- Difetto Interventricolare posteriore, tipo "canale atrioventricolare"
- Canale Atrioventricolare
- Valvola Aortica o Polmonare Displasica

In due terzi dei pazienti con Canale Atrioventricolare sono presenti anomalie extracardiache, che nel 45% dei casi rientrano nel quadro di una Sindrome di Down [21]. Minoritaria è invece l'associazione con le anomalie monogeniche, dove la più frequentemente rappresentata è la Sindrome di Noonan. Concludendo, possiamo vedere come solo nel 30% dei casi vi sia un'origine sconosciuta o multifattoriale.

5. Anomalie della crescita “direzionata”: Sono rappresentate da quell'insieme di anomalia a carico del processo chemiotattico che si conclude con l'aggregazione del seno venoso nell'atrio destro:

- Ritorno Venoso Polmonare Anomalo Parziale
- Ritorno Venoso Polmonare Anomalo Totale
- Difetto Interatriale di tipo Seno Venoso

La maggior parte di queste CC presenta un'eziologia multifattoriale, in assenza di marcate associazioni a quadri sindromici e a malformazioni. Le più frequenti anomalie cromosomiche correlate a questo gruppo sono la Sindrome di CATeye e la Sindrome di Turner, mentre le forme Monogeniche sono molto più rare e dominate dalla Sindrome di VACTERL (acronimo che descrive una associazione di difetti congeniti rappresentati da: anomalie vertebrali, atresia anale, cardiopatie, fistola tracheoesofagea, atresia esofagea, anomalie renali e difetti articolari).

6. Anomalie del situs e dell'ansa: Fanno parte di questo gruppo tutte quelle Cardiopatie indotte da un'alterazione del fenomeno di Lateralizzazione Cardiaca. Durante la terza settimana di sviluppo embrionale, si verifica il fenomeno di Lateralizzazione sinistra-destra del cuore, essenziale step per la formazione di ambedue i margini cardiaci. Il processo è contraddistinto dalla reazione a catena di importanti fattori di crescita (NODAL), ormoni (Serotonina) e geni (PITX2). Il PITX2 è stato riconosciuto come il gene principale per l'unilateralità sinistra di tutto il corpo, garantendo il raggiungimento della normale locazione asimmetrica degli organi sinistri (cuore, milza, stomaco) [22]. Quando questo gene si presenta con un'espressione ectopica, al di fuori dalle cellule del lato sinistro dell'organismo, condurrà alla patogenesi di difetti di lateralità come Sindromi Eterotassiche:

- Isomerismo destro
- Isomerismo sinistro

- Situs Indeterminato

L'Isomerismo destro è una condizione patologica caratterizzata dalla presenza di una duplicazione degli organi di destra e dall'assenza di quelli di sinistra. Nello specifico si definisce per la presenza di: fegato in posizione mediana con i lobi destro e sinistro di uguale grandezza, polmoni trilobati, vena cava inferiore e l'aorta addominale situate dallo stesso lato della colonna vertebrale con tutte e due le auricole atriali di tipo destro. Nell'Isomerismo sinistro si verificherà la condizione opposta: i polmoni saranno ambedue bilobati, le due auricole atriali avranno morfologia sinistra, il fegato sarà sempre in posizione mediana ma, non avremo il tratto epatico della vena cava inferiore, il cui drenaggio sarà condotto nella Azigos. In tutti e due gli Isomerismi si potrà verificare la sindrome Cardiosplenica caratterizzata da Polisplenia a sinistra e Asplenia a destra. Quando non vi è una evidente alterazione del fenomeno di lateralizzazione si parla di Situs Indeterminato, definito da un insolito rapporto fra organi toracici e addominali, nel quale alcuni hanno caratteristiche di destra e altri di sinistra, determinando un'impossibilità nello specificare la lateralità isometrica. Concludendo, possiamo vedere come l'Isomerismo sia una forma di Eterotassia caratterizzata da organi duplicati a morfologia unilaterale, o tutti destri o tutti sinistri.

Oltre alla classificazione proposta da Clark, esistono numerose modalità di raggruppamento per le diverse Cardiopatie, da quelle puramente anatomo/patologiche a quelle più fisiologiche. Da un punto di vista clinico per esempio, le CC vengono divise in Mayor e Minor. Sono considerati Mayor solo quei difetti cardiaci che necessitano di un intervento chirurgico, o un cateterismo cardiaco interventistico, entro e non oltre il primo anno di vita; quest'ultimi ad oggi si riscontrano con un'incidenza di 4 su 1000 nati cardiopatici vivi.

Per quanto la classificazione di Clark sia utile per capire a fondo la morfogenesi delle Cardiopatie Congenite, per l'analisi statistica del nostro studio abbiamo preferito dividere le Cardiopatie seguendo un altro tipo di classificazione, al fine di individuare le possibili correlazioni fra queste e le anomalie placentari [23]. In questa suddivisione vediamo come le CC vengano ordinate in cinque sottocategorie a seconda della loro fisiologia, del compenso o scompenso emodinamico che determinano, e dell'outcome generale che inducono nel

paziente:

1. Nel Gruppo 1 troviamo le CC caratterizzate dalla presenza di un ventricolo singolo con ostruzione aortica, intesa come generica ostruzione all'efflusso sistemico ventricolare:
 - Sindrome del cuore sinistro ipoplastico
 - Ventricolo sinistro a doppia entrata (DILV) con coartazione aortica/ ipoplasia dell'arco aortico

2. Il 2 Gruppo è rappresentato dalle CC con mono-ventricolo e ostruzione polmonare, determinata da alterazioni a carico della valvola semilunare polmonare, o dell'arteria polmonare, con o meno coinvolgimento della valvola tricuspidale:
 - Atresia polmonare a setto interventricolare intatto, ma con severa ipoplasia del ventricolo destro.
 - Atresia della Tricuspidale con ventricolo destro ipoplastico e atresia dell'arteria polmonare

3. Il Gruppo 3 è contraddistinto dalla presenza di CC bi-ventricolari emodinamicamente instabili, ovvero quelle cardiopatie che necessitano di una correzione chirurgica, o interventistica, d'urgenza, nel periodo fetale o neonatale:
 - Tetraogia di Fallot
 - Coartazione aortica/ ipoplasia dell'arco aortico con setto interventricolare intatto.
 - Coartazione aortica/ ipoplasia dell'arco aortico con difetto interventricolare.
 - Truncus arterioso
 - Stenosi polmonare con normale ventricolo destro
 - Stenosi aortica con normale ventricolo sinistro
 - Atresia polmonare con difetto interventricolare
 - Ventricolo destro a doppia uscita (DORV), con o meno ostruzione polmonare.
 - Canale atrioventricolare completo
 - Anomalia di Ebstein della tricuspidale in forma grave
 - Finestra aortopolmonare
 - Interruzione dell'arco aortico con difetto interventricolare.

4. Del Gruppo 4 fa parte una sola CC che è stata considerata separatamente in quanto non rientra in nessuno dei gruppi precedentemente descritti:
 - Trasposizione delle grandi arterie (TGA)
5. Il Gruppo 5 è composto dalle rimanenti CC, definibili come bi-ventricolari ed emodinamicamente non significative, ovvero tutte quelle CC che potenzialmente non necessitano di un intervento d'urgenza in epoca fetale o neonatale:
 - Difetto interventricolare muscolare
 - Difetto interventricolare perimembranoso
 - Vena cava superiore sinistra persistente
 - Coartazione aortica semplice
 - Arteria succlavia destra aberrante
 - Arteria succlavia sinistra aberrante
 - Ritorno venoso polmonare anomalo
 - Difetto Interatriale di tipo ostium secundum
 - Forame ovale pervio
 - Aneurisma della fossa ovale

1.2 La placenta

La placenta è considerata uno dei più importanti organi per la salute fetale e materna, essendo in grado di influenzare la patogenesi sia di anomalie dello sviluppo fetale, che di alcune malattie materne gravidanza-correlate, come la Pre-eclampsia. Viene descritta come l'interfaccia primaria tra la madre e il feto durante tutta la gravidanza [24]. La placenta è un organo altamente differenziato e specializzato, di origine esclusivamente fetale, di cui rappresenta la struttura con maggiori dimensioni [25]. È ritenuta il più importante annesso embrionale (struttura di derivazione dal prodotto di concepimento, ma non facente parte di quest'ultimo) essendo l'unico fra questi annessi a non andare incontro ad involuzione durante la gravidanza, a differenza dell'allantoide e del sacco vitellino. Già dalla 12 settimana possiamo parlare di placenta definitiva, la cui struttura risulta composta da: funicolo, membrane amniocoriali e disco coriale [26].

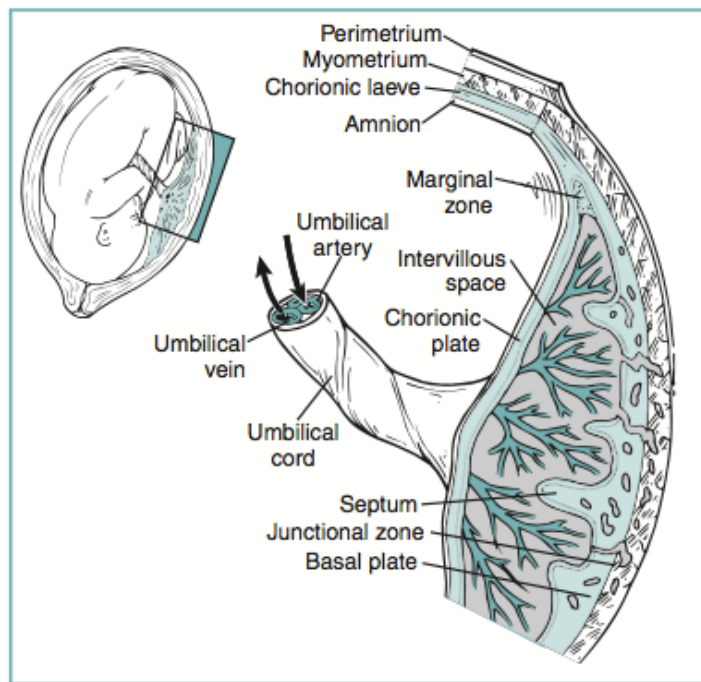


Figura 2

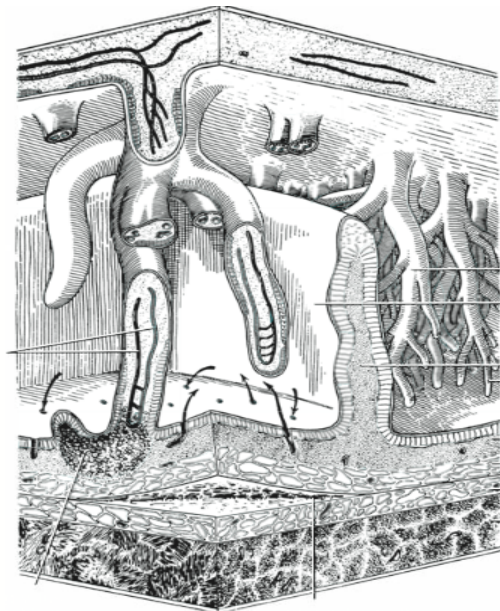
Struttura anatomica della placenta definitiva. *Immagine tratta da “the Placenta, Anatomy, Physiology and Transfer of Drugs, Capitolo 4.*

Il **funicolo** è quella componente placentare che permette il collegamento fra il disco coriale ed il feto. Presenta un andamento spiraliforme ed è rivestito di epitelio squamoso cubico cilindrico semplice che, da un lato continua con la cute del feto, dall'altro costituisce l'epitelio dell'amnios. Il suo asse centrale è formato da tessuto connettivo lasso che prende il nome di gelatina di Wharton, quest'ultima è formata da una miscela di mucopolisaccaridi, fibre di collagene e plasmacellule, e ha il compito di proteggere i vasi ombelicali. All'interno del funicolo vi decorrono tre strutture vascolari, due arterie e una vena; contrariamente a quello che avviene nella circolazione sistemica adulta, le arterie ombelicali trasportano il sangue deossigenato dal feto alla placenta, mentre la vena ha il compito di trasportare sangue ossigenato dalla placenta al feto. Tipicamente le arterie si spiralizzano intorno alla vena, la quale mostra invece un decorso pressoché rettilineo all'interno del funicolo. Nessuna di queste strutture vascolari presenta né la tonaca avventizia, né l'innervazione di parete [27].

Il **sacco amniotico** è una struttura deputata a contenere al suo interno il liquido amniotico, il feto con il suo funicolo ed è composto da tre membrane amniocoriali concentriche che, spostandoci dall'interno verso l'esterno del sacco, sono rappresentate dall'amnios, dalla membrana coriale e dalla decidua capsulare. L'amnios riveste tutto il sacco amniotico, andando poi a rivestire anche il funicolo, dal quale acquisisce l'epitelio squamoso di rivestimento. La membrana coriale [28], o Corion, è composta da uno strato reticolare, formato da fibroblasti e macrofagi, e da cellule con abbondante citoplasma eosinofilo. In corrispondenza del disco corale, il corion continua senza demarcazione nel tessuto coriale dei villi, costituendo il corion frondoso, il quale si estende lungo tutto il polo di impianto della blastocisti e va a raccogliere al suo interno i villi che permettono gli scambi. Nel lato opposto, ovvero il polo della blastocisti che aggetta nel lume uterino, troveremo il corion leave, caratterizzato dall'assenza dei villi, andati precedentemente in atrofia. Fra l'ottavo e il decimo giorno dalla fecondazione, l'endometrio uterino, a causa dell'effetto che estrogeno, progesterone e hBCG hanno su di esso, subisce una ipertrofia ed iperplasia delle ghiandole, completando il fenomeno che prende il nome di decidualizzazione. I prodotti derivati da questa trasformazione saranno: la decidua basale, la decidua capsulare e quella parietale. La decidua capsulare riveste tutta la blastocisti e, a livello del suo sito di impianto, continua senza interruzioni con la decidua basale. La decidua parietale si occupa di rivestire tutto l'utero, esclusa la sede di impianto della blastocisti. A circa tre mesi dalla fecondazione, la decidua parietale si fonde con quella capsulare, andando a formare la decidua vera, la quale verrà espulsa durante il parto.

Il **disco coriale** [29] o piatto coriale, è una struttura di forma discoide, composta da due versanti, uno materno e uno fetale, e dall'albero villare. Il versante fetale, o amniotico, appare liscio e lucente, rivestito da epitelio amniotico, sotto il quale si sviluppano le ramificazioni dei vasi amniotici, dalla cui confluenza origineranno i vasi del funicolo. I vasi amniotici si distribuiscono lungo tutto il disco coriale fino ad arrivare ai villi staminali, costituendo così la componente fetale della circolazione placentare [30]. Il versante materno del disco coriale si interfaccia con la decidua basale e mostra un aspetto lobulato, poiché in esso si trovano le unità macroscopiche fondamentali del disco coriale, i cotiledoni [24, 25].

In ogni placenta matura troviamo in media sette cotiledoni principali, da ognuno dei quali si formano tre o quattro cotiledoni minori. Ogni cotiledone è delimitato esternamente dal piatto basale (costituito dalla stria fibrinosa di Nitabuch e da cellule del trofoblasto extravillare), internamente dal versante fetale corionico e lateralmente da i setti intercotiledonari; al loro interno, i cotiledoni contengono le ramificazioni dell'albero villare e gli spazi intervillari. Nella parte centrale del cotiledone troviamo la camera di espansione, intorno alla quale si sviluppano i villi meglio ramificati, andando a costituire la componente più attiva per gli scambi materno-fetali di tutto il cotiledone. Il complesso formato dalla stria fibrinosa e dai setti intercotiledonari costituisce il sistema di contenimento della ramificazione distale dell'albero villare [31]. In questo complesso si diffonderà il sangue materno, originario delle arterie spirali, che, percorrendo il cotiledone dalla periferia verso il centro, raggiungerà i villi di scambio. Il sangue verrà quindi drenato in direzione opposta, verso la regione marginale del cotiledone, alla quale corrispondono profondamente i seni venosi della decidua, da cui si origineranno le vene uterine. Si completa così la componente materna della circolazione placentare. L'albero villare, o cotiledonare, è quindi l'insieme di tutti i villi coriali, ovvero le unità microscopiche fondamentali del disco coriale.



*Figura 3 Struttura dell'albero villare.
Immagine tratta da "the Placenta,
Anatomy, Physiology and Transfer of
Drugs, Capitolo 4.*

La struttura dei villi vede: un'asse di connettivo vascolare con vasi di diverso calibro a seconda del tipo di villo, una tonaca media con cellule muscolari lisce, un rivestimento trofoblastico. Il tronco dell'albero è costituito dai villi staminali di 1 e 2 ordine che originano dal versante fetale del disco coriale e raggiungono la stria di Nitabuch e il piatto basale ai quali si ancorano. Al loro interno accolgono i vasi amniocoriali e presentano una funzione esclusivamente di trasporto del sangue. Da essi si formano i villi staminali di 3 ordine, i quali daranno vita ai villi intermedi immaturi e maturi, i rami dell'albero. I primi sono massimamente rappresentati nel terzo trimestre di gravidanza, e possono influenzare sia la crescita che la maturazione del disco coriale, attraverso la formazione o di villi staminali o di villi intermedi maturi.

Da quest'ultimi si svilupperanno i villi terminali, i veri e propri villi di scambio, ovvero le foglie dell'albero villare. I villi terminali presentano una struttura che ricorda molto il glomerulo renale, con un asse centrale di sinusoidi e un rivestimento sinciziale. Dai villi staminali e da quelli maturi possono formarsi i villi di ancoraggio, i quali garantiscono la stabilizzazione di tutto l'albero villare, mediante la loro adesione alla stria fibrinotica. Infine, troviamo un ultimo tipo di villi, i mesenchimali. Questi possono originare dai villi intermedi, sia maturi che non, e costituiscono la riserva funzionale della placenta. Sono infatti in grado di maturare in villi terminali durante tutta la gravidanza, a seconda delle richieste fetali. Concludendo, possiamo vedere come i villi staminali, gli immaturi e i mesenchimali, si distribuiscano nella parte centrale dell'albero, andando a circondare la camera di espansione cotiledonare, zona di affluenza del sangue materno. Viceversa, i villi maturi e quelli terminali, si distribuiscono nella parte periferica dell'albero, vicino alla zona di ritorno venoso. Infine, possiamo vedere come la struttura che si occupa degli scambi sia costituita da cinque strati che [31], andando dall'esterno verso l'interno, saranno formati da: un sottile strato di sinciziotrofoblasto, circondante il villo, la membrana basale del sincizio stesso, uno strato di tessuto connettivo interposto fra il sincizio e il villo, la membrana basale del capillare villare e l'endotelio del capillare stesso.

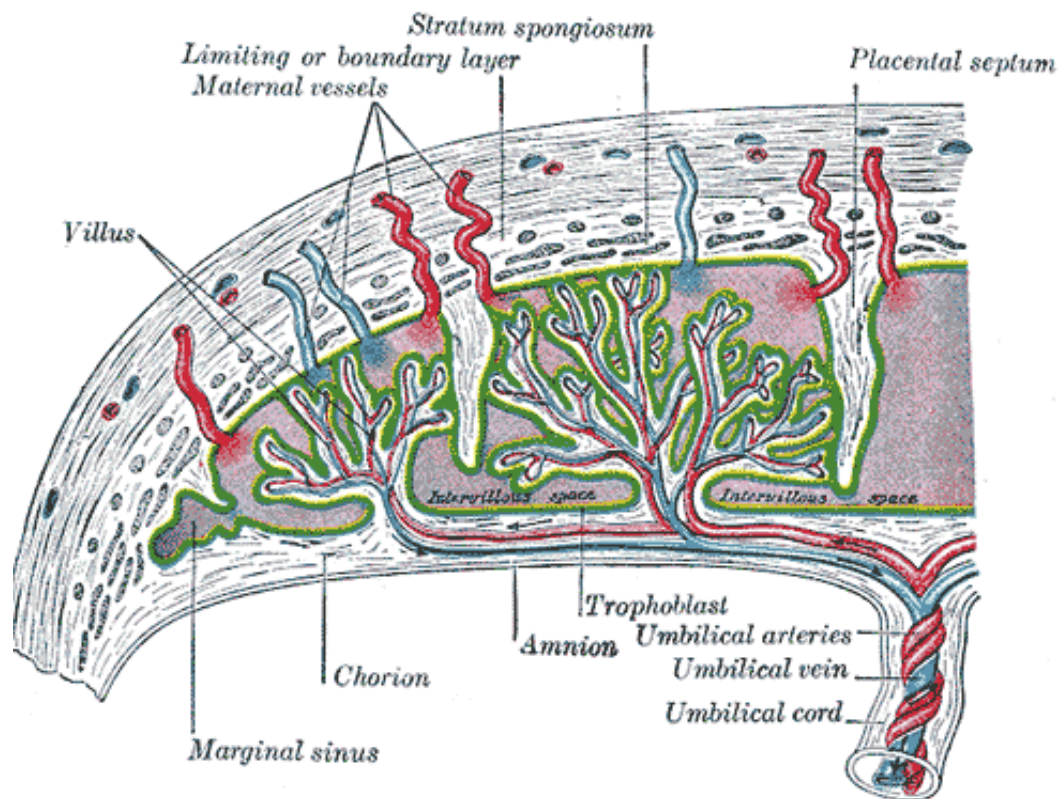


Figura 2 Anatomia della placenta.

A termine della gravidanza la placenta avrà una forma discoidale, con un peso medio di 500g, un diametro di 15-20cm e uno spessore di 2-4cm. La sede di impianto corretta risulta essere la superficie interna del corpo uterino, sia nella faccia anteriore che in quella posteriore. Il funicolo avrà una lunghezza di circa 50cm e un diametro di 1-2.5 cm. Infine, il volume del liquido amniotico, che tenderà a diminuire nel corso di tutta la gestazione in modo inversamente proporzionale alla crescita fetale, raggiungerà un volume di soli 500 ml a termine della gravidanza [32].

La placenta svolge molteplici funzioni che le consentono di sostituire le azioni del sistema renale, respiratorio, epatico, gastroenterico, endocrino e immunitario durante lo sviluppo embrionale; Le principali azioni di cui si occupa sono rappresentate da [33]:

- Funzione respiratoria: permette la diffusione semplice dei Gas respiratori, arrivando a garantire nel periodo finale della gravidanza, un'estrazione di 20-30mL/minuto di Ossigeno dalla circolazione materna. La percentuale di Ossigeno che raggiunge il feto non dipende dalla sua Pressione Parziale, come nell'adulto, ma dalla sua capacità di distribuzione, quindi dalla efficienza dei vasi sanguigni fetali [34].
- Funzione trofica: permette lo scambio fra sostanze nutritive ed elettroliti, con prodotti di scarto [35].
- Funzione Immunitaria: durante il suo sviluppo, il feto è in grado di produrre solo i frammenti del Complemento, quindi l'immunità anticorpale, di tipo IgG, proviene esclusivamente dalla madre attraverso la placenta, permettendo l'acquisizione di un'immunità precoce fetale, attraverso un meccanismo esclusivamente passivo [36].
- Funzione ormonale: fra gli ormoni più importanti la Placenta produce il Progesterone, che permette il mantenimento della gravidanza, e gli Estrogeni, i quali stimolano la crescita uterina e lo sviluppo della ghiandola mammaria. Un altro ormone prodotto dalla placenta è la Somatomammotropina (ormone lattogeno placentare), un analogo del GH che sostiene la crescita fetale, utilizzato in laboratorio come marker di funzionalità placentare [37].

L'amnios, parte integrante della placenta, da solo svolge importanti funzioni che influiscono nella crescita del feto [38]:

- Funzione protettiva meccanica: essendo un liquido è in grado di ammortizzare la maggior parte degli urti di natura meccanica.
- Mobilità del feto: permette al feto di muoversi e crescere liberamente
- Funzione termica: è in grado di mantenere una temperatura costante, impedendo l'eccessiva dispersione del calore.

Il ruolo chiave della placenta è quindi quello di garantire un corretto e sano sviluppo del microambiente materno fetale, andando potenzialmente ad influenzare tutti i processi di sviluppo, soprattutto nel periodo iniziale dell'organogenesi. È noto il fatto che la placenta sia un organo molto mutabile, essendo in grado di adattarsi morfologicamente e funzionalmente alle richieste reciproche fetali e materne, e che sia un organo particolarmente complesso,

l'unico che può essere coltivato, scartato e nuovamente ricreato nello stesso soggetto. Secondo l'ipotesi di de Barker, o teoria delle origini fetali [39], condizioni patologiche o anomalie placentari, alterando le funzioni svolte dalla placenta durante lo sviluppo del feto, sarebbero in grado di influenzare la patogenesi di alcune importanti malattie dell'età adulta, come l'aterosclerosi, l'ipertensione e il cancro [40].

Per poter comprendere meglio l'intricata struttura e le complesse funzioni di questo organo, un team di Anatomopatologi di diversa nazionalità, hanno creato la 'Review di Amsterdam, Sampling and Definition of Placental Lesion' [41], un documento ufficiale che permette di uniformare, sia le tecniche di campionamento che quelle di descrizione anatomopatologiche della placenta a livello mondiale, superando uno dei principali problemi nello studio di quest'organo, ovvero l'uso di differenti metodiche di analisi dei diversi centri e l'impossibilità di unificare tutti i dati ottenuti a livello mondiale. Nel documento sono descritti tutti i passaggi necessari per poter analizzare e campionare la placenta:

1. Campionamento della placenta: Comprende lo studio dei parametri biometrici e l'analisi macroscopica della Placenta, del Cordone e delle Membrane:
 - Peso della placenta: fisiologicamente il peso a fine gravidanza è di circa 500g.
 - Dimensioni del disco placentare: espresse in lunghezza, larghezza e spessore.
 - Descrizione del cordone ombelicale: studio del diametro, della lunghezza e della modalità di inserimento nella placenta.
 - Descrizione delle membrane: studio del colore, dell'opacità e della sede e modalità di rottura.
 - Descrizione di eventuali lesioni: in termini di numero, sede e volume di parenchima che queste influenzano.

È noto come il rapporto fra il peso del feto e quello della placenta sia un possibile indicatore della funzionalità placentare nella crescita fetale e che, sia le dimensioni placentari che il diametro del cordone, possano essere associati a complicazioni della gravidanza, soprattutto rappresentate dalla restrizione della crescita intrauterina (in inglese Intra Uterine Growth Restriction o IUGR) e Diabete Gestazionale. Un punto molto importante riguarda le inserzioni anomale del cordone, eccentrica, marginale e velamentosa. Queste sono spesso presenti in gravidanze ad aumentato

rischio di eventi avversi, come la nascita prematura. La ragione di questa associazione, potrebbe risiedere nel fatto che il posizionamento anomalo del cordone porta ad un'alterata perfusione del feto, influenzando negativamente il microambiente di crescita, determinando come conseguenza un'alterazione a carico dello sviluppo fetale.

2. Malperfusion vascolare materna nel letto placentare: è noto come la malperfusion ad alta velocità possa essere dannosa per la placenta durante tutto il periodo di gestazione, inoltre è rinomato il fatto che diverse alterazioni delle arterie spirali possano presentarsi nel contesto di IUGR e della preeclampsia. In questo gruppo vedremo raccolte tutte quelle anomalie, macro e microscopiche, che conducono ad un'alterata perfusione della componente vascolare materna:

- Infarti: definizione del numero e della sede.
- Emorragie retroplacentari: definiti come accumuli di sangue al di sotto della decidua.
- Cronicità degli infarti: definizione del criterio temporale, recenti o remoti.
- Ipoplasia distale dei villi: descritta come la presenza di villi distali scarsi in relazione allo stelo villare centrale.
- Maturazione villare accelerata: vista come la presenza di villi ipermaturi, piccoli e corti, rispetto all'età di gestazione.
- Arteriopatia deciduale: include arteriosi, necrosi fibrinoide, ipertrofia murale, perivasculite cronica, assenza del rimodellamento delle arterie spirali e trombosi arteriosa.

Il riscontro di emorragia retroplacentare in sede anatomopatologica, risulta essere il corretto indicatore per la conferma della diagnosi clinica del distacco placentare.

3. Malperfusion vascolare fetale: le lesioni che rientrano in questo gruppo, sono probabilmente causate da un ostacolo al flusso cordonale, indotto da fenomeni di diversa natura, fra i quali ritroviamo l'ipercoagulabilità e l'ipossia:

- Trombosi: si dovrà specificare il tipo, arteriosa o venosa, e la sede.
- Villi avascolari: sono la presenza di villi terminali completamente privi di capillari.

- Deposizione intramurale di fibrina: sarà necessario specificare la sede, subendoteliale, intramuscolare o intramurale, e il tipo, occlusivo e non-occlusivo.
 - Villus stromal vascular karyorrhexis: descritti come villi terminali caratterizzati dalla presenza al loro interno di cellule ematiche di origine fetale, come eritrociti nucleati, leucociti e cellule endoteliali.
 - Obliterazione dei vasi staminali: è causato da un inspessimento della parete del vaso, con conseguente obliterazione del lume del vaso stesso.
 - Ectasie vascolari: descrive la presenza di vasi con diametro luminare quattro volte superiore a quelli normali limitrofi.
4. Maturazione villare ritardata: questa lesione è abbastanza tipica dopo la 36° settimana, mentre risulta rara prima della 34°. Si caratterizza per la presenza di un gruppo di villi monotoni con scarse membrane sinciziali, citotrofoblasto continuo e capillari centrali.
- Schema di classificazione: si dovrà specificare se queste sono focali o diffuse e la loro sede.
5. Studio analitico della presenza di infiammazione e infezione:
- Descrizione dell'infiammazione: posizione, caratteristiche, tipo di vasi coinvolti.
 - Infiammazione subcorionica: presenza di neutrofili nello spazio intervillare subcorionico.
 - Villiti di origine sconosciuta: comprendono tutte le villiti la cui diagnosi non è nota.
 - Villite con obliterazione del vaso staminale: descritto come un danno a carico della parete muscolare del vaso, direttamente mediato dalle cellule infiammatorie.
 - Altre lesioni infiammatorie: comprendono le vasculiti eosinofile, intervillosite cronica e deciduiti croniche.
 - Infezioni intrauterine ascendenti

Avendo descritto le principali CC e le modalità di campionamento delle AP, cerchiamo adesso di chiarire che tipo di correlazione vi sia tra lo sviluppo di patologie a carico dell'organo Cuore e dell'organo Placenta.

Il cuore e la placenta sono i principali organi vascolari nella vita fetale; il loro sviluppo embriologico avviene pressoché in parallelo e utilizza molti geni e

percorsi molecolari comuni, come la segnalazione canonica del Wnt / β -catenina e le vie del metabolismo dei folati [42]. La teoria che descrive questa importante sinergia fra lo sviluppo cardiaco e placentare prende il nome di “Asse Cuore-Placentare” [43]. Secondo questo modello, una qualunque perturbazione a carico di geni comuni nello sviluppo del feto e della placenta, potrebbe portare a conseguenze sia sulla morfogenesi cardiaca che su quella placentare, supportando l’ipotesi secondo la quale le anomalie placentari siano effettivamente associate alle cardiopatie fetali.

Purtroppo, ad oggi non è ancora certo l’effettivo rapporto fra i due organi, per cercare di far più chiarezza su questo problema, analizzeremo i principali processi embriologici che conducono allo sviluppo del cuore e della placenta, così da poter verificare se vi sia un’effettiva correlazione embriologica fra i due organi.

1.3 Embriologia placentare

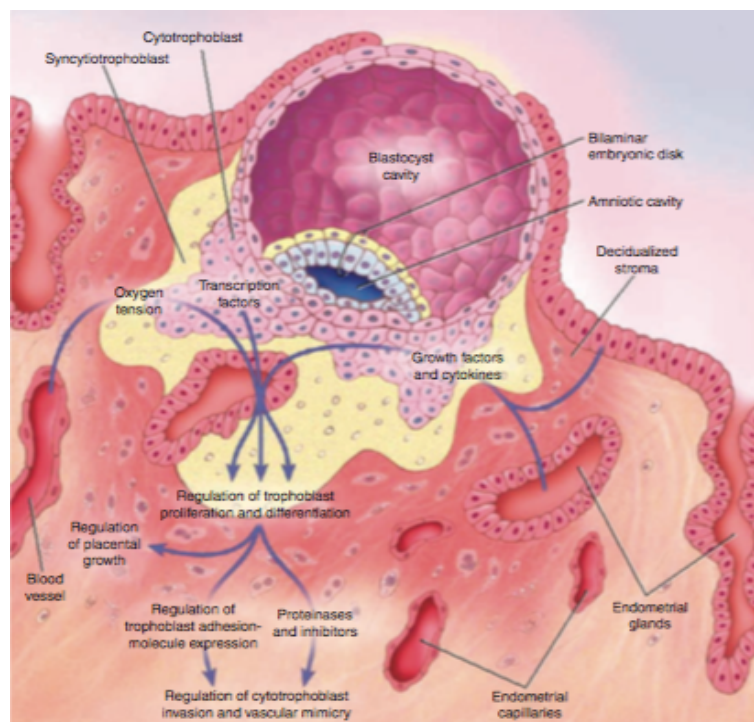


Figura 5 Impianto della Blastocisti e invasione del trofoblasto. *Immagine tratta da Fetal Cardiology, Yegel.*

Lo sviluppo della placenta [44] esordisce a seguito di un'aumentata richiesta di nutrienti da parte del feto, non più in grado di sopravvivere grazie alla sola diffusione semplice delle molecole. I meccanismi che porteranno alla formazione della placenta definitiva iniziano già all'8°giorno di gestazione quando il Trofoblasto, parte esterna della Blastocisti, si organizza in due strati: il Citotrofoblasto e il Sinciziotrofoblasto. Anche le cellule dell'Embrioblasto, parte interna della Blastocisti, si differenziano in due gruppi: l'Epiblasto circondante, insieme agli Amnioblasti, la cavità amniotica e l'Ipoblasto, nel quale si svilupperà il sacco vitellino; dall'unione dell'Epiblasto con l'Ipoblasto si formerà il “disco germinale bilaminare” fetale. Durante il 9°giorno, nel Sinciziotrofoblasto compaiono dei vacuoli che conflueno, porteranno alla formazione di lacune, definendo lo “stadio lacunare del Trofoblasto”. Contemporaneamente nell'ipoblasto si svilupperà il sacco vitellino primitivo, cavità delimitata da cellule ipoblastiche e dalla membrana di Heuser, sottile strato cellulare originario dall'ipoblasto, grazie alla migrazione di alcune di queste cellule verso la superficie interna del Citotrofoblasto. Dall'11° al 12° giorno il Sinciziotrofoblasto, erodendo i capillari materni adiacenti alla sede di impianto della Blastocisti, permette al sangue della madre di invadere il sistema lacunare, garantendo così la primaria “Circolazione utero-placentare”.

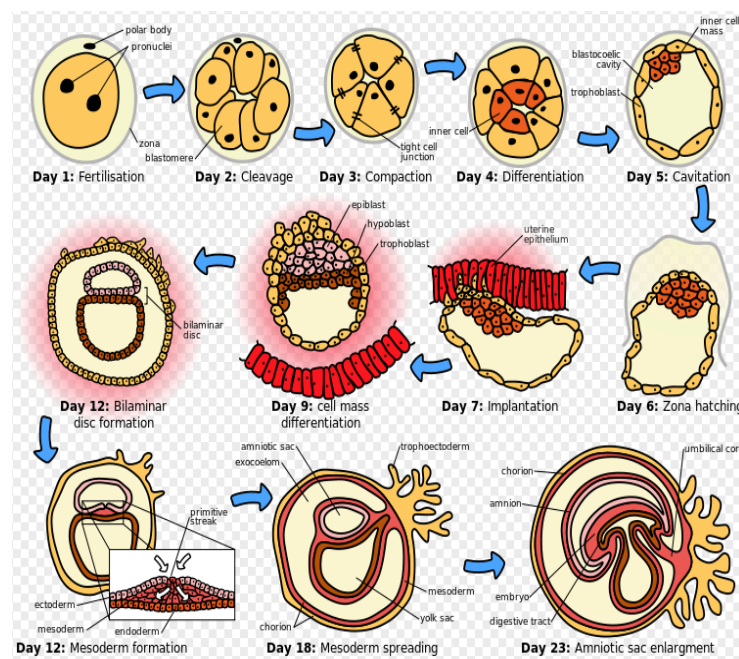


Figura 6 Percorso evolutivo embrio-placentare, nelle prime fasi dopo l'impianto.

Nel frattempo, un gruppo di cellule originarie dal sacco vitellino si organizza in un sottile strato di connettivo lasso, il Mesoderma Extraembrionale che, andando a ricoprire la parte interna del Trofoblasto, costituirà la placca corionica. Dallo sviluppo del mesoderma extraembrionale deriverà la “cavità corionica”, spazio che separa l’Embrioblasto dal Trofoblasto quasi completamente, interrompendosi nella zona di passaggio del peduncolo di connessione, futuro Cordone Ombelicale. Dal 13° giorno, alcune cellule del Citotrofoblasto iniziano ad espandersi nel Sinciziotrofoblasto dando vita ai Villi Primari, estroflessioni di gruppi cellulari con un core di citotrofoblasto e un rivestimento di sinciziotrofoblasto. Nel medesimo momento, le cellule dell’Ipoblasto si organizzano a formare il sacco vitellino secondario.

La 3° settimana rappresenta un momento fondamentale per lo sviluppo dell’embrione, durante questo periodo avvengono infatti importanti modifiche che costituiranno le fondamenta per lo sviluppo terminale fetale. Le trasformazioni che contraddistinguono questo periodo sono racchiudibili in tre grandi gruppi [45]:

- **Gastrulazione:** è contraddistinta dallo sviluppo del disco Trilaminare, composto dai tre foglietti germinali, derivati dalla migrazione delle cellule dell’epiblasto. L’endoderma origina dalla fusione di alcune cellule epiblastiche nell’ipoblasto, il mesoderma si forma dalla deposizione di alcune cellule dell’epiblasto nella zona di transizione fra l’ipoblasto e l’epiblasto, l’ectoderma infine risulta costituito da tutte quelle cellule epiblastiche che rimarranno nell’epiblasto stesso.
- **Notogenesi:** vede lo sviluppo del Notocorda, la cui origine deriva dall’iniziale invaginazione delle cellule prenotocordiali che, attraverso la fossetta primitiva, raggiungono la placca precordale; Nella placca faranno seguito numerose modifiche a cui conseguirà la formazione della Notocorda, un cordone cellulare solido delimitato da due membrane, la buccofaringea prossimalmente e la colacale nella regione distale.
- **Evoluzione dei villi e formazione dell’Allantoide:** durante la formazione della membrana cloacale, nella parete posteriore del sacco vitellino si forma un diverticolo, l’allantoide, che andrà a far parte del peduncolo di connessione. Nel frattempo, i villi primari subiranno delle importanti modifiche: inizialmente acquisteranno un core centrale di cellule mesodermiche, divenendo villi secondari, successi-

vamente svilupperanno dei vasi sanguigni propri, passando quindi a villi terziari o terminali.

Dalla 3° alla 8° settimana avverranno tutte quelle importanti modifiche che condurranno all'Organogenesi. Dall'ectoderma origineranno sia il Sistema Nervoso Centrale, attraverso il fenomeno della Neurulazione, che le cellule accessorie periferiche (melanociti, cellule detritiche...), derivate dallo sviluppo delle creste neurali. Il mesoderma si dividerà in due tipi: Parassiale e Laterale. Dal primo si svilupperanno 42 coppie di somiti, da cui si formeranno le vertebre, i muscoli e tessuti molli limitrofi, mentre il Laterale si organizzerà in Parietale e Viscerale. Da questi si formeranno tutte le pieghe, il derma, le ossa, parte del tubo digerente e i vasi sanguigni del corpo. Infine, dall'endoderma, diviso in intestino anteriore, medio e posteriore, si formerà tutto il rimanente apparato digerente.

Per quanto concerne lo sviluppo vero e proprio della placenta, andremo ora ad analizzare le principali modifiche che la caratterizzano:

- Modificazioni del Trofoblasto: dal Citotrofoblasto si formeranno i Villi Liberi, piccoli villi che si aggettano negli spazi intervillosi. Il Sinciziotrofoblasto, per evitare la commissione di sangue fra la madre e il feto, formerà una “barriera” grazie alla sua fusione con l'endotelio vascolare, separando la circolazione materna da quella fetale.
- Sviluppo del corion frondoso e della decidua basale: nelle prime settimane di gravidanza, il polo embrionale risulta completamente ricoperto da villi, i quali costituiscono il “corion frondoso” che, insieme alla placca corionica, di derivazione dal mesoderma extraembrionale, costituirà la componente fetale della placenta definitiva. La componente materna placentare è invece formata dalla decidua basale, uno strato funzionale endometriale che si trova direttamente a contatto con il corion frondoso. Infine, l'amnios e il corion fondendosi, andranno a costituire la membrana amniocoriale, determinando l'obliterazione della cavità corionica.

Dall'inizio del 4° mese la placenta sarà costituita dalle due componenti, quella materna e quella fetale, delimitate rispettivamente dalla placca deciduale e da quella corionica, separate fra loro mediante l'interposizione degli spazi intervillari ripieni di sangue materno. Tra il 4° e il 5° mese, la decidua estroflettendosi negli

spazi intervillari porterà alla formazione dei setti deciduali che, sepimentando il versante materno placentare, formeranno i Cotiledoni.

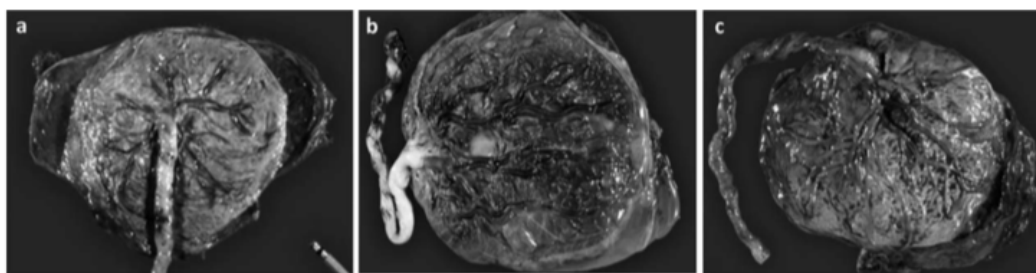


Figura 7 Modalità di inserimento del cordone, tra cui: Centrale (a), Marginale (b) ed Eccentrico, (c). Non sono mostrati il Velamentoso e il Paracentrale (> 3 cm dal margine).

Immagine è tratta da: Placenta Characteristics of fetus with CHD, Albalawi 2016.

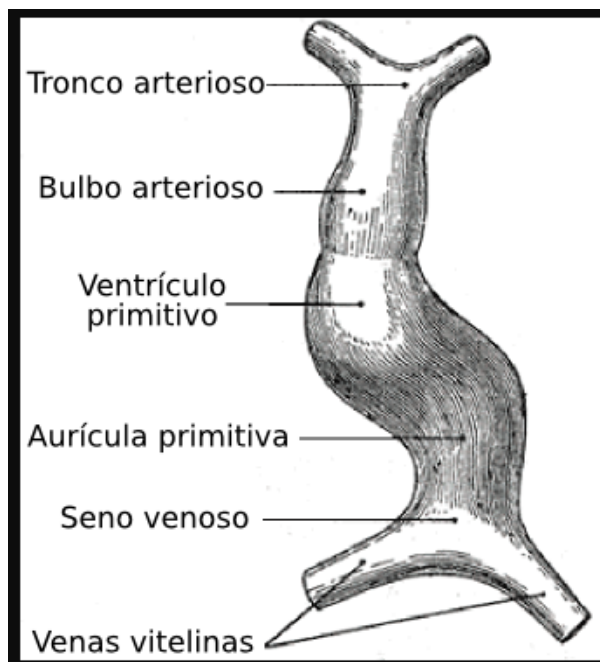
Lo sviluppo del Cordone Ombelicale [46] inizia con la fusione dell'amnios all'ectoderma embrionale, dai quali deriva una struttura circolare chiamata "anello ombelicale primitivo". Durante la 5^a settimana tre strutture attraversano l'anello primitivo: il peduncolo di connessione, contenente l'allantoide e i vasi ombelicali, il sacco vitellino con i vasi vitellini ed il canale che collega le cavità intraembrionali a quelle extraembrionali. Durante lo sviluppo fetale, l'amnios avvolge e fonde fra di loro il peduncolo di connessione e il sacco vitellino, da cui deriva il Cordone Ombelicale Primitivo. Per tutta la gravidanza l'amnios continua ad espandersi, portando alla progressiva obliterazione della cavità corionica, del sacco vitellino ed infine dell'allantoide; ciò che rimane all'interno dell'anello ombelicale primitivo sarà il Cordone Ombelicale definitivo, costituito dai vasi ombelicali, due arterie e una vena, circondati dalla gelatina di Wharton, a funzione protettiva. Per quanto concerne la modalità di inserimento del cordone nella placenta, si considerano il Centrale e il Paracentrale come le modalità fisiologiche, mentre l'eccentrico, il velamentoso e il marginale quelle anormali. Si definiscono Centrali quei cordoni che si inseriscono al centro del disco placentare, Paracentrali quelli a più di tre centimetri di distanza dal margine del disco, Eccentriche tutte quelle inserzioni poste a 3 cm, o meno, dal margine del disco, Marginali quelle poste direttamente sul margine del disco e velamentose quelle inserzione che si

posizionano direttamente sulle membrane placentare, piuttosto che sul disco della placenta.

Una delle particolarità strutturali più interessanti della placenta riguarda la conformazione dei vasi sanguigni. I vasi placentari presentano un'origine ibrida, in parte materna e in parte fetale, e al termine della gravidanza ricevono circa il 40% della gittata cardiaca materna. Sappiamo come le due circolazioni, materna e fetale, siano costantemente separate durante tutta la gravidanza per mezzo dell'interposizione fra queste della membrana placentare, di derivazione corionica. Grazie alla presenza di questa membrana, possiamo considerare la placenta umana come un organo di tipo Emocoriale [47].

1.4 Embriologia Cardiaca

Intorno alla 3^o settimana di gestazione, le cellule cardiache progenitrici di derivazione epiblastica, migreranno verso la regione craniale embrionale dove, disponendosi a ferro di cavallo, costituiranno il Campo Cardiogeno Primario (CCP), dal quale originerà: l'atrio destro, l'atrio sinistro, il ventricolo sinistro e



parte del ventricolo destro. L'area in cui si trova il CCP è nota come la "regione cardiogena" ed è contenuta all'interno della cavità pericardica primordiale. La zona di efflusso e la parte mancante del ventricolo destro si formeranno dal Campo Cardiogeno Secondario (CCS) a fine della 3^o settimana, derivato dal mesoderma splanchnico.

Figura 4 Rappresentazione del Tubo Cardiaco

Progressivamente il Campo Cardiogeno Primario si disporrà in due tubi appiattiti, che fondendosi porteranno alla formazione del Tubo Cardiaco [48]. Questo canale riceverà, nel suo polo caudale il drenaggio venoso e dal polo basale pomperà sangue, attraverso il primo arco aortico, nell'aorta dorsale. Il tubo cardiaco completerà il suo processo di allungamento mediante l'aggiunta delle cellule del CCS nella sua estremità craniale, divenendo l'Ansa Cardiaca [48]. A circa 22 giorni, in senso cranio-caudale, l'Ansa Cardiaca sarà costituita da:

- Bulbo cardiaco: da questo si formerà la porzione trabecolata del ventricolo destro e il tronco arterioso, che darà vita alla parte prossimale dell'aorta e all'arteria polmonare.
- Giunzione bulbo-ventricolare: esternamente corrisponde al solco bulbo-ventricolare, internamente invece si restringerà formando il forame interventricolare primitivo.
- Porzione ventricolare: in questo periodo di gestazione risulta costituita solo da un Ventricolo comune.
- Giunzione atrioventricolare: composta dal canale atrioventricolare.
- Porzione atriale: formata da un atrio comune e contenuta all'interno della cavità pleurica.
- Cono del cuore: che darà origine al tratto di efflusso dei due ventricoli.

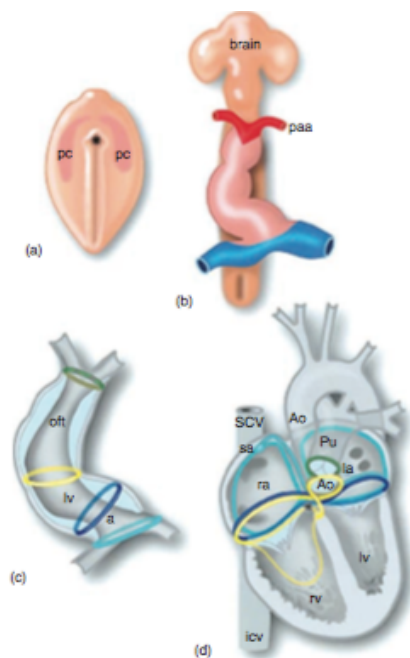


Figura 9: a) Stria Primitiva. b) Tubo cardiaco primitivo, con le vene cardinali sinistra e destra in blu, e il polo arterioso in rosso.

c)organizzazione segmentale del tubo cardiaco, rappresentata da: atrio primitivo (a), ventricolo sinistro primitivo (lv) e tratto di efflusso (spesso). (d) cuore definitivo con: nodo sinusale (sa) Ao, aorta; icv, vena cardiaca inferiore; la, atrio sinistro; LV, ventricolo sinistro;

Pu, tronco polmonare; ra, atrio destro; rv, ventricolo destro; SCV, vena cardiaca superiore.

Immagine tratta da Fetal Cardiology, Yegel.

Dal 23° giorno l'Ansa inizierà a ripiegarsi su sé stessa, andando a completare il suo processo di formazione il 28° giorno circa. Dalla 4° settimana potremo assistere ad importanti modifiche in campo vascolare: il sangue proveniente dalla vena vitellina, dalle vene ombelicali e dalla vena cardiaca comune, confluirà nei corni destro e sinistro cardiaci, attraverso i quali si immetterà nel seno venoso. Alla fine della 10° settimana, il corno destro del seno e le sue vene si amplieranno notevolmente, mentre molte delle vene del corno sinistro andranno in obliterazione, lasciando solo la vena obliqua dell'atrio e il seno coronarico. Il corno destro verrà quindi incorporato nella regione atriale, permettendo la formazione: a destra delle valvole della vena cava inferiore, e a sinistra di quelle del seno coronario.

Fra il 27° e il 37° giorno si svilupperanno i principali setti cardiaci, la cui origine deriva dalla modifica di specifiche masse tissutali chiamate cuscinetti endocardici. Dalla protrusione di questi cuscinetti in particolari aree cardiache nasceranno: il setto interatriale, atrioventricolare, la parte membranosa del setto

interventricolare, e il setto di separazione del canale aortico da quello polmonare.

La formazione del setto interatriale inizia nella 4° settimana, quando un gruppo di cellule provenienti dal tetto dell'atrio comune, scenderanno a falce verso i ventricoli, costituendo il Septum Primum, il quale risulterà delimitato inferiormente da una piccola apertura che prende il nome di Ostium Primum. Alcune cellule della porzione superiore del Septum Primum andranno in apoptosi, formando una seconda apertura detta Ostium Secundum, mentre le cellule della parte inferiore del Septum Primum replicandosi, porteranno alla chiusura dell'Ostium Primum. Parte delle cellule della regione mediale dell'atrio destro, riproducendosi, andranno a formare un altro setto, il Septum Secundum. A separare i due setti si interporrà il Forame Ovale, una “valvola” fisiologica fetale che garantisce il passaggio di sangue dall'atrio destro a quello sinistro [49].

Il setto atrioventricolare deriva dalla fusione di quattro cuscinetti endocardici, destro, sinistro, ventrale e dorsale; successivamente, dal tessuto mesenchimale che circonda i due orifizi atrioventricolari, si formeranno la valvola Mitrale e quella Tricuspidale [50].

Alla fine della 4° settimana le pareti mediali dei ventricoli in accrescimento si fonderanno, andando a formare la componente muscolare del setto interventricolare, che si completerà con l'interposizione, nel forame interventricolare, della parte membranosa, precedentemente formatasi [51].

Durante la 5° settimana da ciascun lato del tronco di efflusso, si formano due rigonfiamenti di cuscinetti endocardici. Questi andranno a crescere in direzione del sacco aortico, con un andamento spiraliforme e, dalla loro fusione, si formerà il setto aorto-polmonare, che andrà a separare definitivamente il canale aortico da quello polmonare [52].

Le valvole semilunari derivano dai loro progenitori attraverso la fusione di questi con i cuscinetti endocardici localizzati nel tronco.

1.5 Circolazione utero-placentare e fetale

La circolazione feto-placentare si stabilizza all'inizio della 8^o settimana di gestazione ed è caratterizzata da un progressivo aumento del flusso sanguigno, all'interno delle arterie uterine, e dalla conseguenziale diminuzione della resistenza vascolare al flusso materno, permettendo così una più facile perfusione placentare [53, 54].

La vascolarizzazione arteriosa della placenta è garantita dalle arterie spirali uterine, le quali subiranno importanti modifiche costituzionali già nei primi giorni dopo l'impianto, volte a garantire una corretta perfusione dell'organo. Con l'impianto della blastocisti, alcune cellule del trofoblasto extravillare [55], avanzando verso il miometrio, si divideranno in due componenti: interstiziale invasivo e endovascolare. Parti di trofoblasto interstiziale, invadendo il miometrio uterino, ancoreranno la placenta al tessuto materno. Il trofoblasto endovascolare invece, invaderà le arterie spirali, spostando e sostituendo il loro rivestimento endoteliale. Questo fenomeno garantisce la trasformazione delle arterie spirali da vasi piccoli e con un'alta resistenza intrinseca, a vasi ad alto flusso e a bassa resistenza, permettendo un'adeguata e facilitata perfusione della placenta. Il rimodellamento vascolare, attraverso il quale le arterie spirali diverranno arterie utero-placentari, avverrà sia per mezzo dell'infiltrazione del trofoblasto, che mediante la perdita di miociti dalla tonaca muscolare e di cellule dalla lamina elastica interna; queste componenti arteriose essenziali verranno progressivamente rimpiazzate da materiale fibrinoide [56]. Nelle gravidanze fisiologiche, la trasformazione delle arterie a spirale in arterie utero-placentari è ritenuta completata a metà della gestazione. Tuttavia, anche nelle gravidanze fisiologiche, esiste un gradiente nell'infiltrazione del trofoblasto lungo l'arteria a spirale, il quale fa sì che non tutte le arterie a spirale siano completamente trasformate. Questa trasformazione garantisce la metamorfosi di vasi a spirale di piccolo calibro in arterie utero-placentari dilatate e flaccide, in grado di trasportare circa 600 ml al minuto. Lo scopo principale di tutti questi cambiamenti vascolari è quello di ottimizzare la distribuzione del sangue materno, prima all'interno di una rete vascolare uterina a bassa resistenza e, infine, nella camera intervillare [57,

58].

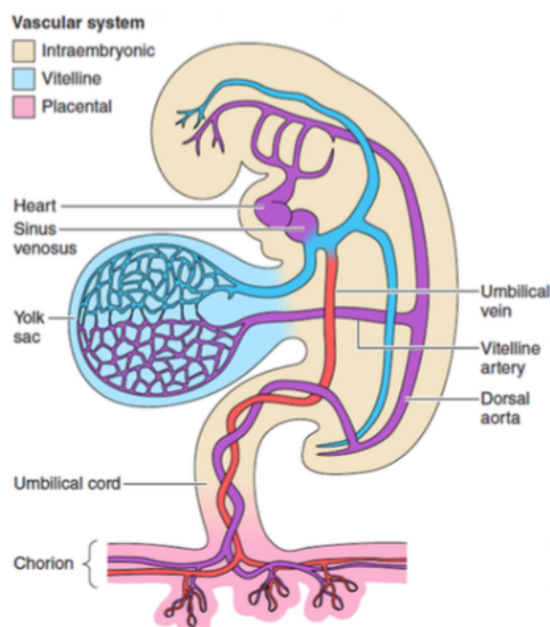


Figura 10

Rappresentazione della
circolazione fetoplacentare

La circolazione intervillare è un sistema aperto, costituito dalle arterie a spirale che si aprono ed irradiano lo spazio intervillare, un grande lago ripieno di sangue che non impone alcuna resistenza al flusso uterino.

Qualora si verificasse un fallimento nel processo di invasione del trofoblasto nell'utero, o nel fenomeno di conversione delle arterie spirali, si genererebbe un substrato favorevole per la patogenesi di importanti malattie placentari e gravidiche. Per esempio, se le modifiche a carico delle arterie spirali non avvenissero ed il loro diametro medio rimanesse basso, si potrebbero verificare fenomeni di ridotta perfusione placentare, con conseguente sofferenza fetale e preeclampsia [59].

La preeclampsia può essere considerata una malattia caratterizzata da due fasi, il cui fattore scatenante è costituito da arterie a spirale con diametro ristretto, le quali determinano un'insufficiente flusso di sangue alla placenta, conducendo ad una disfunzione endoteliale ipossica dei vasi materni e, infine alla sindrome preeclamptica materna [60].

Nella circolazione fetale [61] il sangue ossigenato si porta dalla placenta al feto attraverso la vena ombelicale, da qui arriverà al fegato fetale, dove per la maggior parte bypasserà il parenchima epatico per mezzo del dotto venoso portandosi direttamente in Vena Cava Inferiore. Entrando in Atrio Destro il sangue si unirà a quello proveniente dal distretto superiore, trasportato dalla Vena Cava Superiore, e potrà intraprendere due strade differenti: in parte passerà direttamente all'atrio sinistro attraverso il forame ovale, in parte andrà in ventricolo destro. Il sangue giunto in Ventricolo destro entrerà in Arteria Polmonare ma, essendo le resistenze polmonari fetali molto alte, la maggior parte di questo si porterà direttamente in aorta discendente attraverso il dotto arterioso, un ponte vascolare che unisce l'arco aortico al tronco polmonare durante la vita fetale. Dalla regione caudale dell'Aorta dorsale fetale origineranno le due arterie ombelicali che riporteranno il sangue deossigenato alla placenta, chiudendo il circuito vascolare placent-fetale.

Alla nascita, [62] dal momento in cui i polmoni acquisiscono la funzione di scambiatori di gas, la circolazione passa da quella fetale a quella adulta attraverso le seguenti modifiche:

- Chiusura del dotto arterioso, mediata dalla vasocostrizione indotta dall'aumentata saturazione di O₂.
- Chiusura del forame ovale, dovuta all'aumento della pressione della camera cardiaca sinistra rispetto a quella destra.
- Chiusura della vena ombelicale e del dotto venoso, con trasformazione di questi rispettivamente nel legamento rotondo e nel legamento venoso epatico.
- Obliterazione delle arterie ombelicali con formazione dei legamenti ombelicali laterali.

1.6 La Letteratura fino ad oggi

Le correlazioni fra le anomalie cardiache e della placenta sono sicuramente un argomento poco noto, a conferma di ciò la Letteratura che esplora questi contenuti risulta piuttosto scarna.

Analizzeremo adesso le relative principali pubblicazioni, classificandole in due grandi categorie: quelle che individuano nelle CC il meccanismo patogenetico delle anomalie macroscopiche della placenta, come alterazioni di peso o anomalie della funzione di membrana, e quelle che riconoscono nelle alterazioni angiogeniche e vascolari placentari il meccanismo base per l'induzione delle CC.

Nel primo gruppo rientrano alcuni studi che si sono occupati di analizzare le caratteristiche della placenta in feti con diagnosi di cardiopatia, dimostrando come il peso placentare sia inferiore alla norma in tutti i tipi di CC. Uno dei più importanti, soprattutto grazie alla dimensione del suo campione, è lo studio di Matthiesen et al. "Congenital Heart Defect and Indices of Placenta and Fetal Growth in a Nationwide Study of 924 422 Liveborn Infants" del 2016, [65] basato sulla popolazione danese di 924 422 nati vivi. In questa analisi sono state valutate le relazioni fra le CC, le alterazioni delle dimensioni placentari e quelle dello sviluppo fetale, dimostrando che, nei feti affetti da difetti cardiaci, sia il peso placentare, che le misurazioni della crescita complessiva e della circonferenza cerebrale fetale sono nettamente inferiori rispetto alla norma. Similmente, nello studio di Rychik, del 2018, intitolato "Characterization of Placenta in the Newborn with CHD: Distinctions based on type of cardiac malformation" dell'Ospedale pediatrico di Philadelphia [23] si conferma l'associazione fra il basso peso placentare e le CC e si riconosce nella dTGA, una più marcata correlazione con anomalie placentari, come alterazioni del peso, coriangiosi, infarti e ipomaturità villare, rispetto alle altre cardiopatie. Nello studio multicentrico di Ruiz, del 2016, intitolato "Longitudinal Changes in Fetal Biometry and Cerebroplacental Hemodynamics in Fetuses with Congenital Heart Defect" [66] gli autori si sono concentrati sulla analisi delle correlazioni fra i parametri biometrici fetali e la compromissione emodinamica cerebro-placentare in feti portatori di CC. I risultati che hanno ottenuto descrivono come la circonferenza cranica fetale e il peso alla nascita in bambini affetti da Cardiopatie siano più piccoli del normale e, utilizzando le misurazioni dei flussi Doppler ottenute durante il secondo trimestre, individuano un aumentato indice di pulsatilità al flusso solo della Arteria Uterina e Ombelicale, ma non della Arteria Cerebrale Media (ACM). Queste alterazioni ai flussi sono indicative di un innalzamento del grado di compromissione placentare, ma non avendo irregolarità nel flusso della ACM o di altri parametri biometrici

come il diametro biparietale (BDP), suggeriscono come l'insufficienza placentare possa contribuire ad alterare lo sviluppo e la crescita dei feti portatori di CC, ma non come fattore principale, piuttosto sembrerebbe un cofattore del deficit angiogenico, induttore di anomalie vascolari nei principali organi fetali come cuore e cervello.

Il punto focale di questi studi sembrerebbe essere il basso peso placentare. È logico pensare come una scarsa crescita placentare possa portare ad alterazioni delle sue funzioni, soprattutto quelle trofiche e respiratorie, spiegando come il peso deficitario della placenta possa essere correlato ad una bassa circonferenza cranica ed a misurazioni fetali ridotte. La ragione per la quale una placenta sottopeso conduca alla patogenesi di cardiopatie non è nota; la spiegazione più probabile è che il peso basso placentare e l'insufficienza placentare non siano sufficienti ad indurre da soli la patogenesi delle cardiopatie e che quindi sia necessario sommare a questi altri fattori causativi.

Il secondo gruppo di studi si è focalizzato su di un altro importante argomento: l'associazione angiogenica fra le CC, la circolazione placentare e quella materna, andando anche a definire se e come queste alterazioni possano portare a complicanze materne gravidanza-correlate. Nell'analisi di Ruiz, del 2016, "Placenta-related complications in women carrying a foetus with congenital heart disease" [67] è stato studiato l'andamento del fattore di crescita placentare (PIGF) attraverso prelievo di sangue materno. Il PIGF è una glicoproteina, facente parte della famiglia dei fattori di crescita endoteliale vascolare (VEGF), prodotta dalla placenta, con il compito di indurre proliferazione, migrazione e attivazione delle cellule endoteliali. Quello che hanno riscontrato, è la presenza di bassi livelli di PIGF nel sangue materno in gravidanze contraddistinte da ridotte dimensioni placentari. I risultati ottenuti dallo studio "Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects" [68], di Llorca, 2014, identificano come un aumentato squilibrio di fattori angiogenici-antiangiogenici nella circolazione materna e fetale si associ ad un aumento di difetti dello sviluppo cardiaco. Nello studio "Maternal serum placental growth factor at 11–13 weeks' gestation and fetal cardiac defects" [69] di Llorca, del 2013, si conferma come, nelle gravidanze con feti cardiopatici, vi sia un'alterazione dell'angiogenesi placentare, caratterizzata da

bassi livelli di PIGF, in assenza però di compromissioni a carico della perfusione e della funzione placentare, andando in parte contro alla letteratura precedentemente descritta [23]. Altri studi hanno dimostrato, attraverso modelli animali, come il VEGF giochi un ruolo fondamentale durante tutto lo sviluppo cardiaco.

Dai dati ottenuti dalla Letteratura, sembra essere confermata la correlazione fra la presenza di uno squilibrio fra fattori pro e anti-angiogenici, nel sangue materno e nel cordone ombelicale, con le CC e come l'angiogenesi anomala della placenta possa predisporre ad alterazioni del rimodellamento delle arterie spirali uterine, conducendo ad insufficienza placentare. Quest'ultima sembra essere fortemente associata allo sviluppo di IUGR fetale e Preeclampsia materna. Se il razionale dietro la correlazione fra IUGR e l'insufficienza placentare è dato dall'evidente impossibilità di ottenere una crescita fetale ottimale in presenza di una placenta inadeguata, il meccanismo che correla la Preeclampsia alla patologia placentare risulta invece più complesso. Ad oggi la Preeclampsia materna può essere vista come una conseguenza clinica patologica della disgenesia vascolare placentare e, essendo fortemente associata alle CC fetali, suggerisce l'esistenza di un percorso comune tra queste diverse condizioni [70].

Rientrano nel secondo gruppo anche numerosi articoli focalizzati sulle correlazioni tra le CC e l'anomalo inserimento del cordone nella placenta. Nel documento "Placental Characteristics of Fetuses With Congenital Heart Disease" [71], di Albalawi 2017, è stato dimostrato come l'inserimento anormale del cordone placentare sia associato a CC. Nello stesso studio viene confutata l'associazione fra un patologico rapporto ponderale placenta/peso alla nascita e i difetti cardiaci, confermando invece come la restrizione della crescita intrauterina sia fortemente presente nei pazienti affetti da CC. Nello studio del 2013, di Miyoshi: "Fetal CHD and abnormality of placenta and umbelicalcord" [72] hanno documentato come la presenza di IUGR, cariotipi anormali, inserimento cordonale anomalo e arteria ombelicale singola siano significativamente più alti nei pazienti cardiopatici rispetto al controllo. Inoltre, hanno correlato l'anomalo inserimento del cordone al fumo materno, alle anomalie strutturali placentari e alla restrizione della crescita fetale. Infine, Monienel 1965, scrisse "VelamentousInsertion of the UmbilicalCord" [73] nel quale, si descrive una forte associazione fra un tipo specifico di inserimento anomalo cordonale, il Velamentoso, e le CC, sottolineando l'importanza che lo screening prenatale, effettuato con la

valutazione del inserimento cordonale, avrebbe sulla possibilità di far diagnosi precoce di CC.

Una menzione a parte è necessaria per un gruppo di articoli che si è concentrato sullo studio delle correlazioni genetiche ed umorali fra il cuore e la placenta. Fra questi citiamo: “Recent Advances in Placenta–Heart Interactions”, Maslen 2018[74], in cui gli autori sono partiti dal presupposto che lo sviluppo cardiaco e placentare sia sinergico, concordando sul fatto che vi siano molteplici fattori in grado di determinare le CC, che per tale motivo avranno un’eziologia più probabilmente multifattoriale, rispetto ad esclusivamente genetica. Nel “Near to One’s Heart: The Intimate Relationship between the Placenta and Fetal Heart” [75], Camm2018, sono stati eseguiti esperimenti sui modelli animali geneticamente modificati, dai quali hanno ottenuto nuove informazioni sul rapporto tra la formazione placentare e lo sviluppo del cuore fetale, ritenendo le forze umorali e meccaniche fondamentali nello sviluppo fisiologico e patologico di entrambi gli organi.

1.7 Possibili correlazioni tra CC e Anomalie Placentari (AP): studi preliminari

Nell’ambito della patologia feto-perinatale e pediatrica, particolare rilevanza assumono le anomalie o le franche malformazioni congenite del sistema cardiovascolare.

Il progetto di ricerca stabilito e pensato in origine per lo svolgimento di questo Corso di Dottorato era volto ad indagare se patologie cardiache - o altre malformazioni vascolari - potessero essere correlabili, con meccanismo di associazione o di conseguenza (causalità), con quadri vascolari anomali placentari; in altre parole, lo scopo della ricerca era quello di dimostrare la sussistenza di una ipotetica correlazione tra vasculopatie placentari e malformazioni cardiache fetali, così come avviene in altri ambiti già noti della patologia feto-perinatale.

Ulteriore interesse per tale progetto nasceva, poi, dalla constatazione del fatto che in letteratura, sul tema dell'istologia patologica dei vasi e più in genere del sistema circolatorio nelle sue varie componenti, sono presenti esclusivamente studi e segnalazioni sporadici di singoli casi, per lo più riguardanti casi patologici o, comunque, fuori della norma.

La diagnostica istopatologica in ambito feto-perinatale - non infrequentemente - richiede di effettuare osservazioni sulle caratteristiche strutturali dei vasi, siano essi arteriosi che venosi.

Si tratta, infatti, di porre diagnosi di svariate condizioni displastiche (angio-displastiche), distrofiche (angio-distrofiche), malformative o teratomatose nell'ambito della patologia cardio-vascolare, uno dei temi di maggiore attualità e più sensibili.

In tale diagnostica, vengono prese in considerazione la distribuzione dei vasi, le caratteristiche di ramificazione ed ancora le caratteristiche strutturali della parete.

Le caratteristiche strutturali della parete sono per lo più basate su osservazioni istologiche (isto-morfologiche ed isto-architetture) e citologiche (cito-struttura delle varie componenti dei vasi). Molto più raramente viene effettuata una valutazione morfo-funzionale correlando le caratteristiche citologiche ed isto-architetture con le proprietà funzionali delle singole componenti tessutali.

Inoltre, al di là delle caratteristiche strutturali della rete vascolare arteriosa o venosa fetale, non si possiedono dati corretti sulle singole componenti strutturali delle cellule che costituiscono la parete dei vasi. Le indagini pubblicate sono, infatti, per lo più condotte studiando solo alcune componenti del citoscheletro o alcuni anticorpi mirati a proteine o a parti di proteine contrattili della parete dei vasi, ma difficilmente è dato reperire un quadro globale in cui siano messi a confronto tutti i marcatori della componente muscolare della parete dei vasi attualmente disponibili sul mercato.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze non esiste, poi, uno studio approfondito che monitori lo sviluppo vascolare del feto a seconda delle varie settimane gestazionali e che, pertanto, sia in grado di fornire uno schema sulle caratteristiche morfo-strutturali delle varie tipologie di vasi nei diversi segmenti e settori corporei.

Ciò premesso, appare evidente come un'alterazione precoce - nelle fasi dello sviluppo - della suddetta embriogenesi, possa rappresentare il substrato (scena forma-

tiva) su cui agiscono svariate cause, ad oggi non ancora dimostrate, di malformazioni cardiache.

Certamente uno sviluppo anomalo dei vasi placentari (anch'essi di derivazione vitellina) può rappresentare un segnale indicativo di altre anomalie instauratesi o instauratesi sul sistema cardio-vascolare fetale. Come per gli altri organi, infatti, durante lo sviluppo, anche la formazione dei vasi nelle strutture coriali può essere suddivisa nei seguenti due processi, differenti per meccanismi e controlli coinvolti.

La **vasculogenesi** riguarda la formazione *de novo* di vasi sanguigni dai precursori cellulari dal mesoderma. Compare per la prima volta nello strato mesenchimale del sacco vitellino secondario, ma i primi stadi nello sviluppo di vasi villari sono visti poco dopo (dal 18° al 35° giorno circa). Più avanti nella gravidanza, la vasculogenesi è confinata ai villi mesenchimali che si vanno formando dai villi intermedi immaturi. Nonostante questa restrizione regionale, lo stroma placentare è una ricca fonte di cellule staminali ematopoietiche durante la gestazione. L'**angiogenesi** consiste, invece, nell'espansione del preesistente letto vascolare e riguarda la creazione dei nuovi rami vascolari da quelli preesistenti e la crescita longitudinale dei vasi stessi. Nella placenta questo è il principale meccanismo per lo sviluppo del supporto vascolare dei villi intermedi immaturi, dei villi staminali, dei villi intermedi maturi e dei villi terminali. L'angiogenesi placentare deve essere ulteriormente suddivisa sulla base dei meccanismi e del risultante letto vascolare in:

- "**Branching angiogenesis**", che descrive la formazione di una rete capillare complessa e multipla, sia attraverso il processo di gemmazione capillare che attraverso intersuscezione, dove il lume di un vaso è diviso da una colonna endoteliale;
- "**Nonbranching angiogenesis**" che si basa sull'allungamento dei *loop* capillari già esistenti.

È stato postulato, in passato, che ci sia un grosso cambio nel percorso dell'angiogenesi placentare durante la gestazione, con la "branching angiogenesis" che avviene dal 32° giorno alla 24^{esima} settimana, e la "nonbranching angiogenesis" che predomina da quel momento in avanti (Kaufmann et al. 1985, 2004). Questo concetto è stato ripreso più volte e appare essere basato sull'assunzione che la formazione dei villi terminali, che avviene principalmente nella seconda metà di gestazione, è guidato interamente dall'allungamento capillare e dalla dilatazione.

Non ci sono, tuttavia, dati quantitativi a lungo termine confermant i una riduzione nell'incidenza della gemmazione capillare mentre la gravidanza prosegue.

I più recenti studi di Jirkovska e colleghi (2002) indicano che i villi terminali sono formati verso il termine da dilatazioni capillari e gemmazioni in quasi uguale misura. Di qui l'ipotesi che ci sia un chiaro passaggio tra i due tipi di angiogenesi non appare più sostenibile: i villi intermedi maturi danno origine ai villi terminali attraverso un processo di crescita capillare longitudinale attiva e ripiegamenti (“branching angiogenesis”) anche dopo la 24^{esima} settimana gestazionale.

La prima rete vascolare nei villi si forma a partire dal mesenchima *in situ* e non presenta distinzione tra arteriole, venule e capillari fino alla 8^{esima} settimana; la fusione tra le reti intravillari con i vasi fetali attraverso il peduncolo precursore del cordone ombelicale stabilisce la circolazione feto-placentare. Una vera e propria circolazione attraverso i villi comincia verso la fine del primo trimestre; con il cambio pressorio che si realizza, le cellule del tessuto connettivo si aggregano attorno a tubi endoteliali in modo circolare. Generalmente vengono formate un'arteria e una vena, mentre i restanti vasi formano una rete paravascolare.

L'angiogenesi e la vascolarizzazione villare avanzano indipendentemente dallo sviluppo della circolazione fetale e delle arterie ombelicali, con un conseguente ricongiungimento dei vasi intravillari con quelli derivati dal feto, che penetrano nel disco coriale. La scarsità di ossigeno portato all'embrione nelle prime fasi gestazionali suggeriscono che i meccanismi regolatori della precoce crescita angiogenica siano differenti da quelli che mantengono la vascolarizzazione più avanti nella gestazione.

Dopo l'iniziale formazione dei primi vasi all'interno dei villi primitivi, tra la fine del primo trimestre e l'inizio del secondo aumentano numero, area di superficie e volume dei capillari. Al terzo mese comincia la differenziazione dei villi immaturi in staminali: i vasi centrali acquisiscono sottili strati di cellule contrattili che esprimono alfa e gamma actina del muscolo liscio, oltre che vimentina e desmina; in seguito compare anche la miosina del muscolo liscio. Nei diversi villi il diametro, il numero e la posizione dei vasi variano.

Nei villi staminali c'è un'arteria centrale, nella quale l'endotelio è circondato da pochi strati di cellule muscolari lisce e l'avventizia continua col connettivo senza linee di demarcazione nette; l'arteria è solitamente accompagnata da una vena.

A questi si aggiunge un numero variabile di piccole arteriole e venule, che prevalgono nei villi staminali più piccoli.

Nei villi intermedi maturi i vasi sono la continuazione dei vasi staminali più piccoli: una o due arteriole appaiono istologicamente come tubi di endotelio, coperti da cellule muscolari lisce occasionali. I rami terminali delle arteriole continuano direttamente in uno o due capillari che man mano riducono il calibro e perdono la copertura di muscolo liscio. Nella metà distale dei villi intermedi maturi la rete perivascolare di capillari è assente.

Non c'è una netta demarcazione tra i villi intermedi maturi e quelli terminali; questi ultimi si differenziano perché i capillari hanno dilatazioni e piegamenti oltre ad avere meno connettivo.

I sinusoidi presenti al loro interno sono delle dilatazioni focali dei capillari e sono tipici della placenta matura, essendo fondamentali per gli scambi materno-fetali.

L'accrescimento dei capillari in lunghezza comincia circa alla 25^{esima} settimana e la lunghezza totale aumenta esponenzialmente fino al termine. Questo avviene sia per la proliferazione di cellule endoteliali che per il loro appiattimento e allungamento.

A fronte delle suddette considerazioni, dopo aver effettuato una esaustiva analisi della Letteratura, si è intrapreso un lavoro mirato a prendere sistematicamente in esame una serie di vasi arteriosi fetali di varia tipologia e calibro, che considerasse le varie epoche gestazionali in una progressione condotta settimana per settimana, che esaminasse tutte le componenti strutturali della parete dei vasi arteriosi e che valutasse l'espressione delle proteine strutturali contrattili o comunque coinvolte nella contrazione muscolare.

Sono state considerate le settimane gestazionali a partire dalla 13^{esima} fino al termine della gravidanza (40^{esima} settimana). Per ogni autopsia sono stati isolati l'aorta e i grandi rami che da essa si dipartono. In particolare, sono stati effettuati prelievi standardizzati sui seguenti tratti: aorta ascendente, una delle carotidi comuni, aorta toracica, una delle arterie renali, aorta addominale, una delle arterie iliache comuni.

I sei prelievi per ciascun caso sono stati inclusi in un unico blocchetto di paraffina, in modo da poter confrontare tutti i tratti dei vasi in un'unica sezione. Per ciascuna inclusione sono state allestite sezioni di 3-4 μm di spessore, raccolte su vetrini caricati elettrostaticamente.

Le colorazioni dei vetrini sono state eseguite in modo automatizzato. Sono state effettuate le seguenti colorazioni istochimiche: Ematossilina-Eosina, Tricromica di Masson (per i connettivi) e Weigert-Van Gieson (per le fibre elastiche). Sono state, altresì, allestite reazioni immunoistochimiche con i seguenti anticorpi: Actina Muscolo Liscio (alfa-SMA, clone HHF35, Novocastra Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody, diluizione di uso 1:1000), Desmina (clone DE-R-11, Novocastra Anticorpo Monoclonale Murino Liquido, pronto all'uso), Calponina (Calponin-1, EP798Y, Rabbit Monoclonal Antibody, Cell Marque a Sigma-Aldrich company, pronto all'uso), Smoothelina (Anti-Smoothelin antibody [R4A], abcam, diluizione di uso 1:100).

Parallelamente, partendo dalla occasionale osservazione di un caso di placenta alla 26^{esima} +1 settimana che presentava caratteristiche peculiari e sulla quale, a scopo diagnostico, erano state effettuate - come suggerito in letteratura - le colorazioni immunoistochimiche actina e desmina, sono state valutate le placente dei grandi prematuri giunte alla nostra osservazione nel medesimo modo. Nel caso in oggetto aveva attirato la nostra attenzione il reperto di una diffusa ed importante presenza di cellule leiomuscolari nella parete dei vasi villari di ogni ordine e grado ed in specie in quelli dei villi terminali di scambio o degli intermedi maturi, laddove la letteratura indica che tale componente contrattile non debba più essere presente.

Abbiamo, quindi, considerato le placente di epoca antecedente la 33^{esima} settimana, fissando come limite minimo la 23^{esima} settimana gestazionale, ossia quelle di un'epoca di grande prematurità del feto e di importanti cambiamenti nell'anatomia della placenta stessa.

La casistica considerata comprende le placente appartenenti a quest'epoca gestazionale arrivate all'UOSD di Patologia e Diagnostica Feto Placentare dell'IRCCS Giannina Gaslini nel periodo compreso tra gennaio a maggio 2014, per un totale di 45 placente, di cui 11 relative a parti gemellari. I casi sono stati suddivisi in quattro sottogruppi, sempre in base all'epoca di gestazione, visti gli importanti cambiamenti anatomici nell'albero villare che si realizzano tra un periodo e l'altro: 21-24 settimane, 25-28 settimane, 29-32 settimane, 33-36 settimane.

Per il campionamento effettuato è stato studiato un nuovo protocollo diagnostico, mentre per l'analisi microscopica sono stati stilati degli schemi istomorfologici per i vari sottogruppi, con la descrizione anatomica specifica di ogni fase.

Per quanto riguarda l'analisi macroscopica è stato aumentato il numero dei campioni da 8 a 14 prelievi; ciò al fine di meglio documentare l'eventuale variabilità all'interno di ogni singolo caso.

Lo studio microscopico, partendo dalla valutazione - in prima battuta - con Ematossilina-Eosina, è stato implementato con colorazioni immunoistochimiche *ad hoc* (anticorpo anti-actina muscolo liscio e anticorpo anti-desmina) in campioni selezionati per lo studio della parete dei vasi e dello stroma dei villi, oltre ad altre colorazioni per lo studio del trofoblasto (anticorpo p63, anticorpo anti MIB1, anticorpo anti CK5.1).

Tabella 1: Anticorpi utilizzati

Anticorpo	Clone
Actina-muscolo liscio	HHF35
Desmina	DE-R-11

I risultati della nostra prima indagine, hanno evidenziato che l'Actina Muscolo Liscio Specifica è presente prevalentemente - e con maggiore intensità - nei vasi di maggiore calibro (aorta ascendente, aorta toracica e aorta addominale), mentre è espressa solo in pochi filamenti nei vasi di calibro minore (carotide comune, arterie renali e arteria iliaca comune).

La Desmina, che è tipicamente espressa nel muscolo liscio dei vasi dell'adulto, nei nostri casi non compare in alcuna epoca gestazionale. Lo stesso comportamento ha presentato la Smoothelina. Infine, la Calponina compare solo sporadicamente. Non siamo stati, tuttavia, in grado di rilevare un fattore costante predittivo di tale espressione.

13 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale							
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
15 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale							
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
16 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale							
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
20 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	+	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	+	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria renale	+	+	+	+	-	+	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	+	-

21 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta torcica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	-	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
22 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	+	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	+	-
Aorta torcica	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	+	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	+	-
23 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	+	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	+	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	+	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	+	-
26 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	+	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	+	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	+	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	+	-

27ª SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	-	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
29ª SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	-	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
31ª SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	+	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	+	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	+	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	+	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	+	-
32ª SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Cartoide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	-	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-

35 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Carotide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	-	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-
38 ^a SETTIMANA DI GESTAZIONE							
CAMPIONAMENTO	COLORAZIONI						
	E.E.	W.-V.G. EL	TRCR MASSON	ACT	DESM	CALPON	SMOOTH
Aorta ascendente	+	+	+	+++	-	-	-
Carotide comune	+	+	+	++	-	-	-
Aorta toracica	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria renale	+	+	+	+++	-	-	-
Aorta addominale	+	+	+	+++	-	-	-
Arteria iliaca comune	+	+	+	++	-	-	-



Fig. 1. Actina Muscolo Liscio Specifica: espressione a livello della carotide comune, 21^a settimana di gestazione (4x).

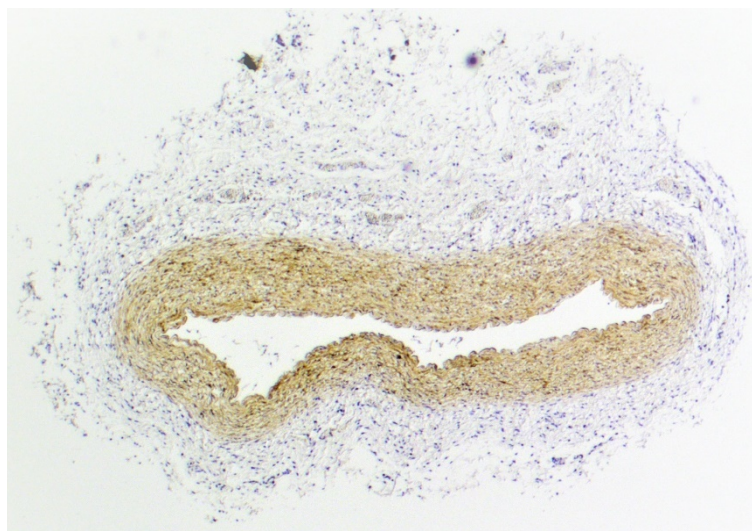


Fig. 2. Calponina: espressione a livello della carotide comune, 20^a settimana di gestazione (4x).

Per quanto riguarda la nostra indagine, nel comparto placentare i risultati ottenuti sono i seguenti:

SETTIMANE 21-24

Totale: 3 placenti, di cui nessuna gemellare.

Villi staminali: la positività è ben definita ed evidente sia nelle pareti dei vasi che nello stroma; le pareti vascolari hanno un'espressione della componente contrattile maggiore rispetto allo stroma.

Lo stroma dei villi staminali e dei villi intermedi maturi ed immaturi presenta variabile quantità di cellule muscolari lisce (actina ml e desmina positive) che tendono a decrementare nettamente nei villi di minor calibro ed in particolare nei villi intermedi maturi.

Villi intermedi maturi: la positività è meno marcata rispetto a quanto riscontrato nei villi staminali, ma comunque espressa in modo evidente sia nelle pareti dei vasi che nello stroma. Le pareti dei vasi mostrano l'espressione degli elementi contrattili in modo leggermente più evidente rispetto allo stroma.

Villi terminali: la positività per gli elementi contrattili è presente ed evidente, anche se più esigua rispetto agli altri sottotipi villari, sia nella parete dei vasi che nello stroma. Le pareti vascolari mostrano una presenza di elementi contrattili più evidente rispetto allo stroma.

Tabella 2: Espressione Actina Muscolo Liscio

Caso	Villi staminali		Villi intermedi maturi		Villi terminali	
	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma	Vasi	stroma
17	+++	++	++	+	++	++
792	++	+	++	++	++	+
1350	+++	++	++	+	++	+

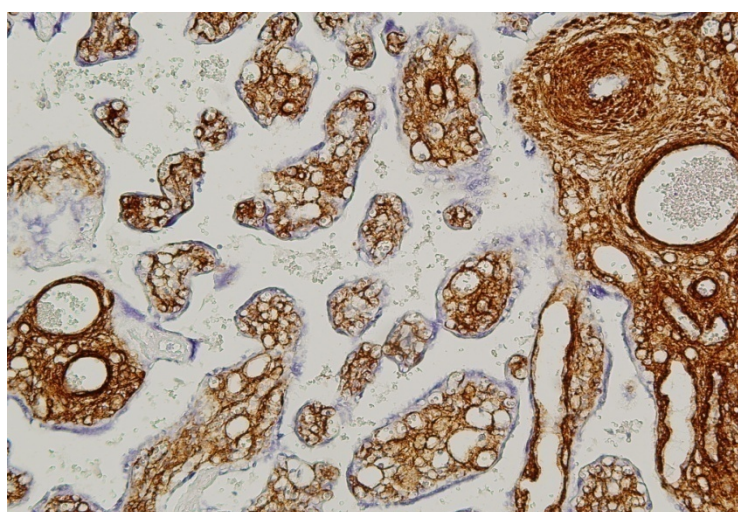


Foto 3: Actina muscolo liscio in placenta di 23+5 settimane gestazionali (Caso 792). Ingrandimento 20x.

SETTIMANE 25-28

Totale: 10 placenti, di cui 3 gemellari.

Villi staminali: la positività è ben definita ed evidente sia nella parete dei vasi che nello stroma; l'espressione degli elementi contrattili nella parete vascolare è più marcata rispetto a quella dello stroma.

Lo stroma dei villi staminali e dei villi intermedi maturi ed immaturi presenta variabile quantità di cellule muscolari lisce (actina ml e desmina positive) che tendono a decrementare nettamente nei villi di minor calibro ed in particolare nei villi intermedi maturi.

Villi intermedi maturi: la presenza di elementi contrattili è maggiormente espressa nella parete vascolare rispetto a quanto osservato nello stroma, dove la positività è comunque visibile anche se in modo meno evidente.

Villi terminali: la positività è presente anche in questo sottotipo villare, anche se in maniera più esigua rispetto a ciò che è stato riscontrato negli altri sottotipi. Le pareti dei vasi villari risultano avere un'espressione maggiore degli elementi contrattili rispetto allo stroma, nel quale in alcuni dei casi analizzati l'actina era espressa in modo molto lieve.

Tabella 3: Espressione Actina Muscolo Liscio

Caso	Villi staminali		Villi intermedi maturi		Villi terminali	
	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma
145	++	++	++	+	+++	++
264	++	+	-	+ (debole)	-	+ (debole)
495	++	+	+	++	-/+	+
580	+++	++	++	+	++	+
1118 A	+++	++	++	++	++	+ (debole)
1118 B	+++	++	+++	+	+ focale	+
1122	+++	++	+++	+	++	+
1277 A	++	+	++	+	++	+ (debole)
1277 B	++	++	++	+	++	+
1381	++	++	++	+	++	+
1421	+++	++	++	+	++	+/-
1748 A	+++	++	++	+	+	+
1748 B	+++	++	++	+	+	+
1748 C	++	+	++	+	++	+

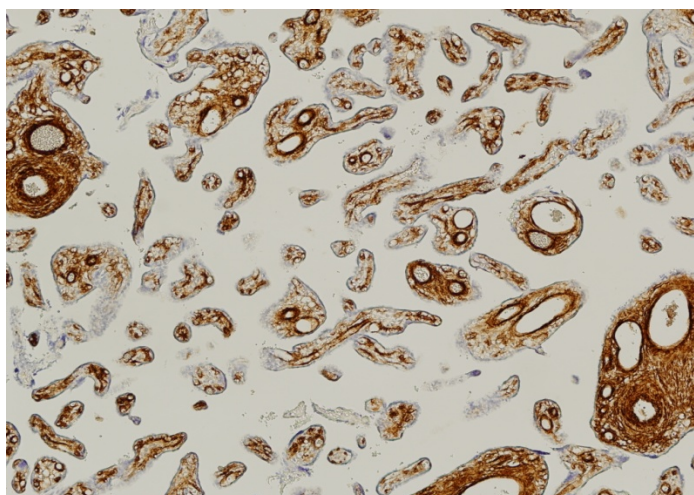


Foto 4: Actina muscolo liscio in placenta di 26+4 settimane gestazionali (Caso 1122). Ingrandimento 10x.

SETTIMANE 29-32

Totale: 25 placenti, di cui 6 gemellari

Villi staminali: la positività è ben rappresentata, sia nella parete dei vasi che nello stroma. La presenza di elementi contrattili sembra essere lievemente meno evidente rispetto ai casi delle settimane gestazionali precedenti (21-24 e 25-28 settimane gestazionali).

Lo stroma dei villi staminali e dei villi intermedi maturi ed immaturi presenta variabile quantità di cellule muscolari lisce (actina ml e desmina positive) che tendono a decrementare nettamente nei villi di minor calibro ed in particolare nei villi intermedi maturi.

Villi intermedi maturi: la positività è presente ed evidente, anche se meno manifesta rispetto a quanto osservato nei villi staminali; le pareti vascolari esprimono la presenza di elementi contrattili in modo maggiore rispetto allo stroma, dove gli elementi contrattili sono presenti in modo esiguo.

Villi terminali: la positività è presente anche se meno evidente rispetto agli altri sottotipi villari, soprattutto per quel che riguarda lo stroma; in alcuni casi analizzati l'espressione degli elementi contrattili nello stroma era molto esigua.

Tabella 4: Espressione Actina Muscolo Liscio

Caso	Villi staminali		Villi intermedi maturi		Villi terminali	
	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma
3	++	+	++	+	+	+
12 A	+++	++	+++	+	++	+ (debole)
12 B	++	+	++	+	++	++
19	++	+	++	+	+	+
37	++	+	+	++	+	++
226 A	++	+	++	+	++	+
226 B	++	+	++	++	++	+
438	++	+	+ (debole)	+	-	+
518	++	+	+	++	++	+
541	+++	+	++	+ (debole)	++	+
568	+++	++	++	+ (debole)	+	+ (debole)
601	++	+	++	+	+	+
825	++	+	++	+	+	-
849 A	+++	++	++	+	+++	+
849 B	++	+	++	+	+	+ (debole)
885	++	+	++	+	++	+ (debole)
1045	+++	++	+++	++	+ (debole)	+ (debole)
1046 A	+++	++	++	+	++	+
1046 B	+++	++	++	+	+	+ (debole)
1150	+++	++	+++	++	++	+
1236	+++	++	++	+	++	+ (debole)
1420	+++	++	+++	++	++	+
1438	+++	++	++	+	++	+

1508 A	+++	++	++	+	++	+
1508 B	+++	++	++	+	+	+
1523	+++	++	++	+?	++	+?
1720	++	+	++	+	++	+ (debole)
1721	++	++	++	+	++	+
1749 A	++	++	++	+	++	+
1749 B	++	+	+	+ (debole)	++	+

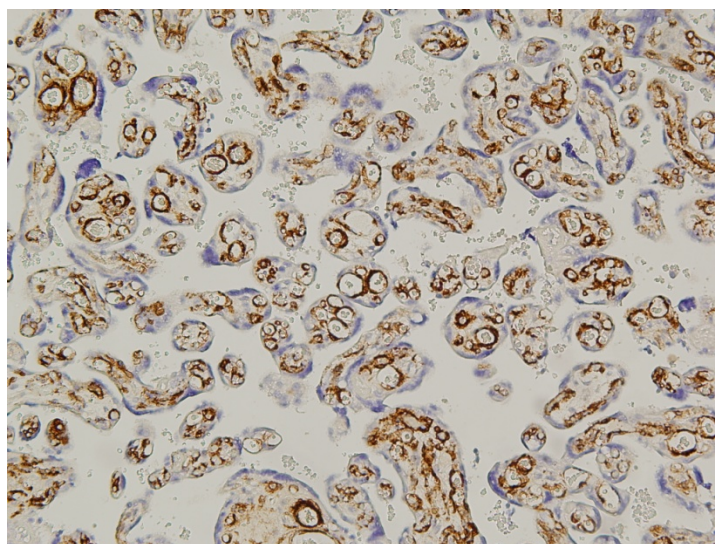


Foto 5: actina muscolo liscio in placenta di 29+5 settimane gestazionali (Caso 541). Ingrandimento 20x.

SETTIMANE 33-36

Totale: 7 placenti, di cui 2 gemellari.

Villi staminali: la positività per l'actina è presente sia nella parete dei vasi che nello stroma, anche se in entrambe le zone villari la presenza degli elementi contrattili è lievemente meno evidente rispetto alle settimane 21-24 e 25-28, mentre è più simile all'espressione ritrovata nelle settimane 29-32.

Lo stroma dei villi staminali e dei villi intermedi maturi ed immaturi presenta variabile quantità di cellule muscolari lisce (actina ml e desmina positive) che tendono a decrementare nettamente nei villi di minor calibro ed in particolare nei

villi intermedi maturi.

Villi intermedi maturi: la positività è ben rappresentata nelle pareti dei vasi, in modo simile rispetto a quanto riscontrato per i villi staminali. Le pareti vascolari presentano un'espressione della componente contrattile maggiore rispetto allo stroma.

Villi terminali: la positività è evidente anche se meno marcata rispetto a quanto osservati per gli altri sottotipi villari; le pareti dei vasi hanno una presenza di elementi contrattili simile a quella dello stroma, in alcuni casi anche meno rappresentata.

Tabella 5: Espressione Actina Muscolo Liscio

Caso	Villi staminali		Villi intermedi maturi		Villi terminali	
	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma	Vasi	Stroma
390	++	+	++	+	++	-
392 A	++	+	+	++	+ (debole)	++
392 B	++	+	++	+	+ (debole)	+
604 A						
604 B						
756						
826						
1274	++	+	++	+	+ a tratti	+
1422	+++	++	++	+	++	++

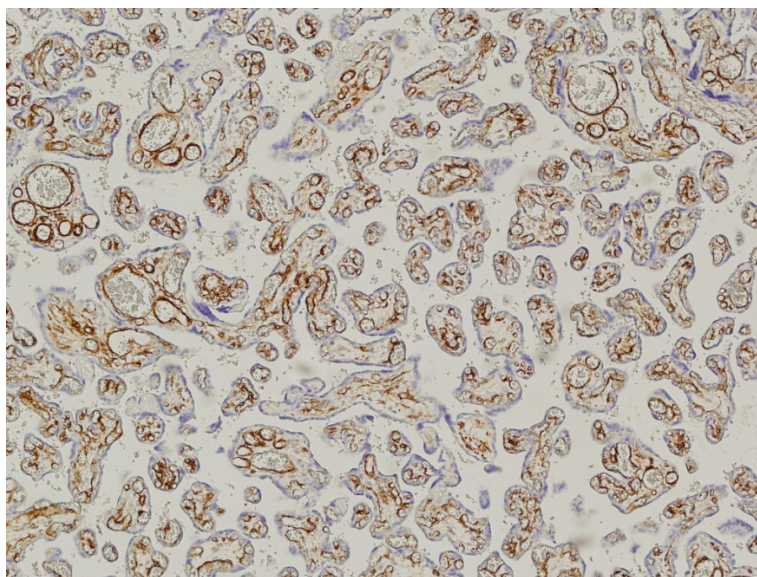


Foto 6: actina muscolo liscio in placenta di 33 settimane gestazionali (Caso 392).
Ingrandimento 10x.

In tutti e quattro i sottogruppi descritti emerge un dato interessante ed inatteso: la positività per l'actina, che persiste nello stroma e nella parete dei vasi dei villi intermedi maturi e dei villi terminali, testimonia in essi la presenza (persistenza) di elementi contrattili di parete.

Il riscontro avuto nel nostro studio non concorda coi dati riportati in Letteratura, facendo riferimento in particolare al trattato "*Pathology of the human placenta*" di Kaufmann (1979): in questo e in altri testi, infatti, le descrizioni microscopiche della placenta ad oggi conosciute, riferite prevalentemente alle placenti a termine di gestazione, affermano che i villi intermedi maturi e i villi terminali non dovrebbero presentare positività all'actina muscolo liscio e, quindi, avere elementi contrattili nella parete dei vasi e nello stroma di sostegno villare. A nostra conoscenza, per ora, non vi sono studi che si siano spinti ad indagare tali reperti in placenti di neonati/feti in età pretermine.

I risultati ottenuti sono stati a nostro avviso rilevanti ed utili perché in grado di fornire una mappatura utile nella diagnostica routinaria, sì da poter rappresentare un punto di partenza dal quale iniziare a definire le caratteristiche morfo-funzionali principali dell'albero villare in queste età gestazionali.

I testi di riferimento (in particolare quello già citato di Kaufmann) trattano di placente a termine, affermando - come detto - che l'actina non si trova nei villi più periferici dell'albero villare (intermedi maturi e terminali). Il dato morfologico sottende una importantissima caratteristica circolatoria secondo la quale la gran parte del letto vascolare coriale della placenta a termine non possiede elementi di modulazione del circolo, sia in senso positivo che negativo.

In estrema sintesi, questo dato fa presupporre che il feto non abbia resistenze del circolo placentare periferico ma solamente una rete vascolare passiva che possa o meno ampliarsi solo a seconda della prevalenza delle forme villari più immature.

Dallo studio è, invece, emerso che tutte le placente dei neonati prematuri da noi analizzate, di età gestazionale compresa tra la 23^{esima} e la 33^{esima} settimana presentano una rilevante componente leiomuscolare di parete (actina e desmina positive) in tutti i vasi villari, ivi compresi quei sottotipi in cui questo elemento contrattile, secondo la Letteratura corrente, non dovrebbe trovarsi.

Particolare e sicuramente meritevole di approfondimento sono stati anche i risultati ottenuti mediante lo studio dei vasi fetali a tal proposito, infatti, è sufficiente pensare a come possa essere modificata l'interpretazione del dato dell'assenza di Desmina nella parete di un vaso arterioso quale l'aorta in caso di una delle più comuni patologia malformative congenite quali la coartazione dell'aorta. Evidenziare l'assenza di Desmina assume, oggi, un significato non negativo ma positivo essendo questa, di norma, mai espressa in qualsiasi epoca gestazionale. Analoga considerazione valga per la Smoothelina.

La Desmina è una proteina da 53kD presente nelle cellule della tonaca muscolare dei vasi sanguigni e coinvolta nella contrazione vascolare. Mediante la formazione di un'impalcatura intorno al disco Z del sarcomero, la Desmina permette la connessione fra il Sarcomero stesso e il citoscheletro cellulare, grazie alla quale garantisce un'integrità strutturale e meccanica alle cellule durante tutta la contrazione, favorendo anche la trasmissione della forza contrattile. Insieme all'Actina, risulta essere un marker proteico del tessuto muscolare durante lo sviluppo embrionale, trovandosi concentrato soprattutto a livello dei somiti e dei mioblasti. Normalmente, il suo contenuto all'interno delle cellule muscolari cresce in parallelo allo sviluppo della cellula stessa, arrestandosi quando questa raggiunge lo stadio di differenziazione finale.

Il nostro secondo obiettivo, è stato quello di prendere in esame sistematicamente, anche una serie di vasi venosi fetali (tenendo in considerazione le varie epoche gestazionali) e della prima infanzia, di varia tipologia e calibro per andare a valutare l'espressione delle proteine contrattili presenti nelle strutture della parete del vaso venoso.

I primi risultati ottenuti sono stati i seguenti:

	Età gestazionale	Campione	Actina muscolo liscio	Desmina
18 A 41 A7	23 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	---
18 A 40 A4	26 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	
18 A 16 A6	29 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	
18 A 14 A34	32 settimane	Collo	+++	---
18 A 42 A33	36 settimane	Collo	+++	---
16 A 61 A3	38 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	---
16 A 56 A24	39 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	+/-
15 A 15 A44	40 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	+/-
16 A 92 A6	40 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	+/-
17 A 104 A3	40 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	+/-
17 A 99 A5	40 settimane	Ventaglio mesenterico	+++	+/-

Come si può vedere da questa tabella risulta chiara l'assenza dell'espressione della Desmina nei primi tre trimestri di gravidanza, mentre invece inizia a comparire con una focale e lieve positività dalla 39° settimana in poi.

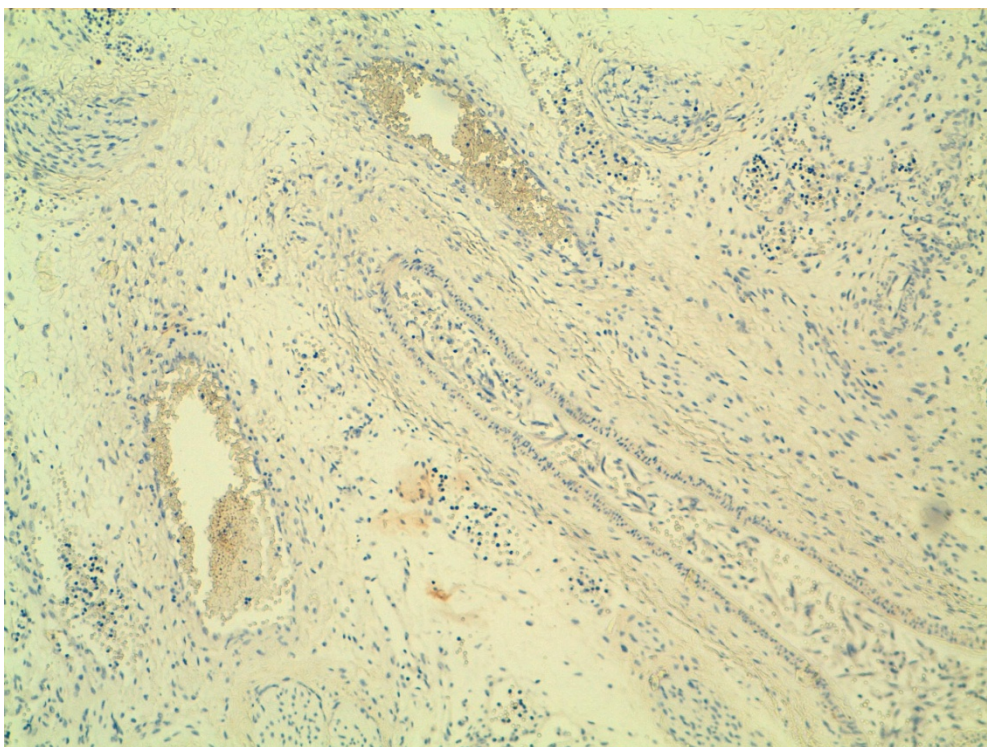


Fig. 7: 18-A-41 Desmina negativa nella parete del vaso venoso.

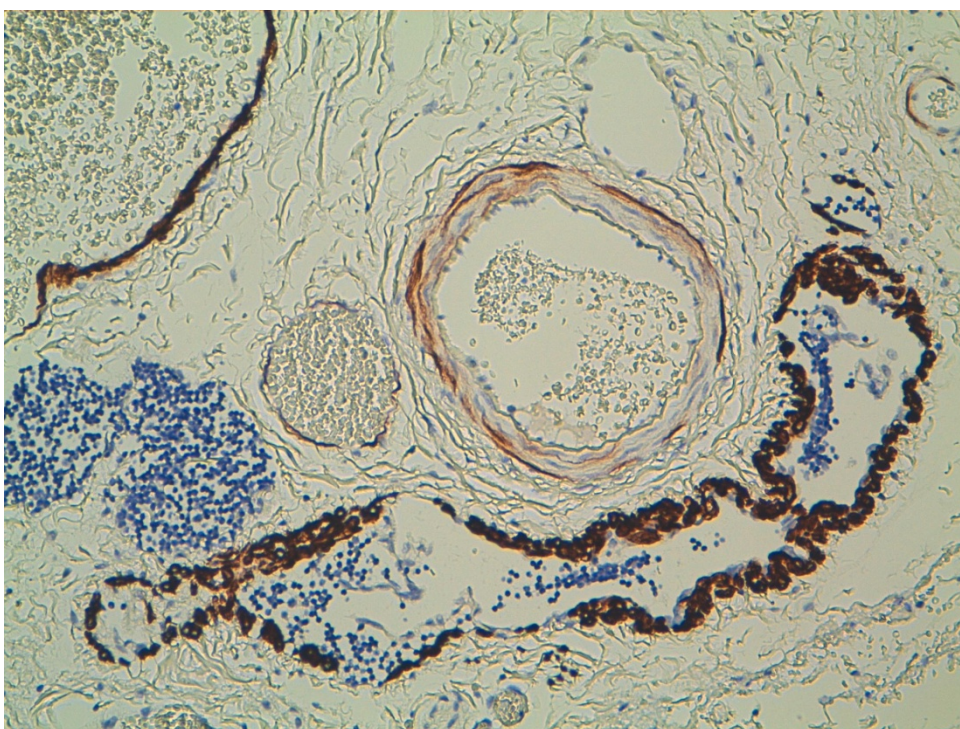


Fig. 8: 17-A-99 Desmina lievemente positiva nella parete venosa

A questo punto, lo step successivo è stato quello di ampliare la casistica ai neonati andando a studiare anno per anno (per i primi 5 anni) la presenza o meno della desmina nella parete dei vasi venosi e i risultati ottenuti sino a questo momento sono i seguenti:

BAMBINI 0-1 ANNO

	Età	Campione	Actina muscolo liscio	Desmina
18 A 61 A32	21 giorni	Vene:cava superiore, cava inferiore, iliaca comune, iliaca interna, iliaca esterna.	+++	---
18 A 03 A4	1 mese	Ventaglio mesenterico	+++	+
18 A 63 A 32	1 mese	Collo	+++	++
16 A 77 A27	2 mesi	Ventaglio mesenterico	+++	---
17 A 26 A16	2 mesi	Ventaglio mesenterico	+++	+ (nelle vene di medio calibro)
17 A 8 A23	3 mesi	Appendice cecale	+++	++
16 A 7 A37	3 mesi	Ventaglio mesenterico	+++	++
15 A 73 A1	3 mesi	Ventaglio mesenterico con linfonodo	+++	+
16 A 83 A18	3 mesi	Collo	+++	+++
17 A 48 A29	4 mesi	Collo	+++	+++
17 A 87 A41	5 mesi	Vena cava superiore	+++	+++
16 A 80 A16	9 mesi	Regione paratimica	+++	---

BAMBINI 1-5 ANNI

	Età	Campione	Actina muscolo liscio	Desmina	CD 31	CD 34
18 B 619 C3	1 anno	Appendice cecale	+++	+++		
17 B 1309	2 anni	Appendice cecale	+++			
17 B 3430 A3	3 anni	Appendice cecale	+++			
18 B 1749 A2	4 anni	Appendice cecale	+++	+++		
18 B 1247 A2	5 anni	Appendice cecale	+++	+++		

La positività della Desmina appare non solo costante ma anche crescente di intensità; per cui preso atto di ciò abbiamo valutato l'espressione della desmina nei neonati, nati prematuri e sopravvissuti per valutare se questa espressione può essere o meno correlata con uno sviluppo morfofunzionale e/o con le modificazioni adattative alla vita extrauterina.

Dai risultati di questi studi si evince che, il fenotipo vascolare della placenta e del feto è completamente diverso. Questo risultato mette in discussione la correlazione fra le anomalie placentari e quelle fetale a patogenesi esclusivamente angiogenica. È probabile quindi che l'associazione fra le anomalie di questi due organi trovi le basi in un'eziologia di tipo multifattoriale, nella quale la componente vascolare gioca comunque un ruolo di primaria importanza, ma non è in grado da sola di indurre la patogenesi di queste condizioni.

1.8 Gli obiettivi del nostro studio

Preso atto dei risultati ottenuti si è presa in considerazione una interruzione del profilo fenotipico tra i vasi placentari e fetali e per tale motivo la ricerca delle cellule endoteliali placentari non pare avere più senso, modulando la ricerca su altri aspetti.

In particolare, abbiamo cercato di individuare le possibili correlazioni tra le CC e le AP, prendendo in considerazione anche fattori di rischio materni e l'outcome neonatale. Abbiamo studiato la correlazione fra le CC e le AP in termini di peso ed alterazioni macroscopiche, in modo bidirezionale, dal generico allo specifico, abbiamo valutato le possibili associazioni angiogeniche fra le CC e le anomalie del cordone, finalizzati ad un anomalo posizionamento o ad un'alterazione nel numero di vasi; infine, abbiamo studiato il tipo di rapporto che esiste fra le CC, la placenta e la madre, attraverso una triplice correlazione statistica.

Ci siamo focalizzati - in un primo momento - sul legame fra le CC e lo IUGR, con l'obiettivo di confermare la letteratura, successivamente abbiamo ricercato la correlazione fra IUGR e anomalie placentare, individuando se e quali di queste potrebbero essere la causa patogenetica del ritardo di crescita.

Infine, siamo andati a valutare se e come alcuni fattori di rischio materni, fra cui il body mass index (BMI) ed età materna superiore ai 35 anni, possano interferire con lo sviluppo sia della placenta che del cuore.

2. Materiali e Metodi

2.1 Caratteristiche dello studio

Il nostro è uno studio osservazionale, retrospettivo, che include tutti i pazienti con diagnosi prenatale di CC nati e seguiti presso l'Istituto Giannina Gaslini (IGG) di Genova nel periodo compreso tra Gennaio 2014 e Marzo 2018. L'analisi dei dati si è concentrata sulla ricerca di possibili correlazioni tra CC, anomalie e lesioni vascolari della placenta e caratteristiche cliniche/fattori di rischio della donna in gravidanza.

2.2 Criteri di inclusione ed esclusione

Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti con una diagnosi prenatale di CC confermata alla nascita, dei quali fosse stata eseguita l'analisi anatomopatologica della placenta materna, il tutto esclusivamente presso IGG.

Sono state prese in considerazione per lo studio tutti i tipi di CC, ad eccezione fatta per le CC Minor (ovvero quelle che, non determinando alcun impatto emodinamico, non necessitano di interventi, chirurgici o di cateterismo, fetali o neonatali, e per le quali non risulta doveroso impostare un programma di follow-up) poiché sono state ritenute improbabili fattori causativi di anomalie placentari. Non abbiamo utilizzato nessun criterio di esclusione riferito alla settimana di gestazione, arruolando donne che hanno partorito a qualunque età gestazionale (pretermine o post-termine), che hanno optato per l'interruzione volontaria di gravidanza (IVG) o che hanno avuto una morte endouterina del feto (MEF). Sono stati inclusi anche feti portatori di quadri sindromici, malattie monogeniche o associazioni malformative.

2.3 Modalità di diagnosi

La **diagnosi di CC** è attuata mediante l'esecuzione di un'ecocardiografia fetale [76, 77] dettagliata transaddominale, attraverso l'utilizzo di apparecchiature dotate di un sistema ad ultrasuoni bidimensionale ad alta risoluzione e provviste anche di

funzione M-mode, Doppler pulsato e continuo e Color Doppler (HP / SONOS 7500; iE33, Philips, Amsterdam, Paesi Bassi). Tipicamente vengono utilizzate sonde settoriali o convesse, a multifrequenza (3-8 MHz), grazie alle quali è possibile ottimizzare la frequenza di emissione in funzione della distanza del cuore fetale. Per lo più si preferisce utilizzare sonde a frequenze più alta (5-8 MHz) fatta eccezione per i casi di adiposità materna o di scarsa ecogenicità dell'addome materno, per i quali può essere necessario utilizzare sonde a frequenza più bassa (3-5 MHz).

L'età gestazionale al momento della valutazione ecocardiografica è determinata sulla base della data dell'ultima mestruazione.

Lo studio ecocardiografico viene eseguito in modo sequenziale ed ordinato e ha inizio con l'individuazione della posizione del feto, attraverso il riconoscimento della testa e della colonna vertebrale.

Una volta compresa la posizione, si passa all'esame morfologico del cuore fetale, che si propone di valutare:

- Il sito viscerale, la posizione e l'asse del cuore
- Le dimensioni del cuore
- Le connessioni veno atriali destra e sinistra
- Le connessioni atrio ventricolari destra e sinistra
- Le connessioni ventricolo-arteriose destra e sinistra

Queste valutazioni possono essere eseguite mediate scansioni trasverse, oblique e longitudinali.

Le scansioni:

- Transversa dell'addome
- 4-camere
- Asse lungo ventricolo sinistro con efflusso aortico (asse lungo di sinistra)
- Asse lungo ventricolo destro con efflusso polmonare (asse lungo di destra)
- Asse corto di destra (obliqua anteriore destra del ventricolo destro)
- Sezione dei 3-vasi (a livello della base del cuore)

sono definite scansioni trasverse ed oblique.

Le scansioni:

- Grossi Vasi (Arco Aortico e Arco Duttale o Polmonare)
- Bicavale (Vena Cava Inferiore e Superiore) sono definite scansioni longitudinali.

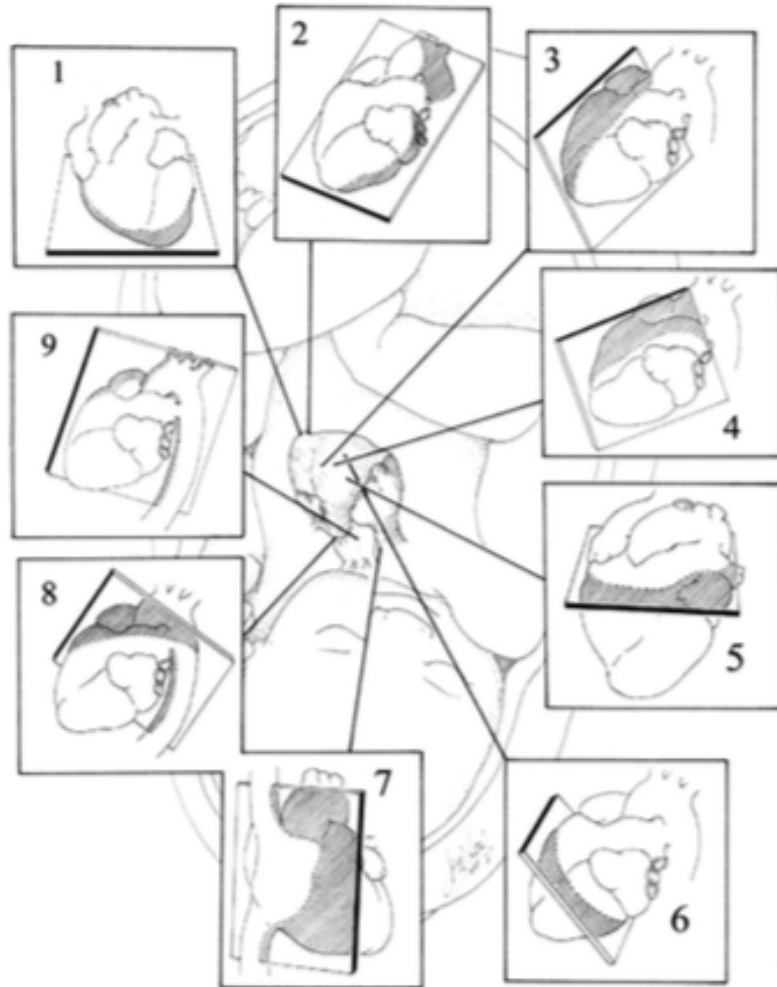


Figura 11: Sequenza delle scansioni ecocardiografiche.

Immagine tratta da Pediatric Cardiology for Practitioners, 2014.

La prima scansione ad essere eseguita è quella trasversale dell'addome, grazie alla quale possiamo valutare la posizione dell'aorta discendente, della vena cava inferiore, del fegato e dello stomaco, tutte strutture che ci consentono di definire il situs viscerico-atriale.

In condizioni di normalità l'aorta risulta essere una struttura circolare a sinistra e al davanti della colonna vertebrale, mentre la cava inferiore sarà posizionata anteriormente rispetto all'aorta ed a destra della colonna vertebrale. La distinzione dei due vasi è facilitata dal fatto che in aorta vi sia un flusso pulsatile mentre, la vena cava tenderà a collabire durante la fase di inspirazione. Il fegato e lo stomaco si trovano agli antipodi dei quadranti superiori dell'addome, il primo a destra, il secondo a sinistra.

La scansione 4-camere permette di attuare lo screening del 50-60% delle cardiopatie maggiori in epoca fetale; questa visione si ottiene partendo dalla scansione trasversa dell'addome e inclinando la sonda leggermente verso l'alto. Le immagini migliori si ottengono quando il feto ha il dorso in sede posteriore, "4-camere apicale", o laterale, "4-camere trasversa".

Attraverso questa scansione possiamo valutare:

- Il sito, la posizione e l'asse cardiaco
- Le dimensioni del cuore
- La grandezza dei due atri e dei due ventricoli
- La simmetria tra sezione destra e sinistra del cuore
- Il setto interatriale e interventricolare
- Le valvole atrio ventricolari
- Le connessioni veno atriali di sinistra
- Le connessioni atrio ventricolari

L'asse descrive l'orientamento rotazionale del cuore nel torace e può essere calcolato come l'angolo formato dal setto interventricolare con il piano anteroposteriore passante per il torace. Normalmente ci troviamo in una situazione di Levocardia, ovvero l'apice cardiaco orientato a sinistra della linea mediana, con un'angolazione di 40°- 45°; una levorotazione maggiore (>60°) o minore (<27°) frequentemente si associa a patologie cardiache primitive.

La posizione cardiaca descrive la collocazione del cuore all'interno della gabbia toracica. Normalmente, 2/3 del cuore occupano l'emittoce sinistro e il rimanente 1/3 si trova nell'emittoce destro. La posizione del cuore può essere anomala per cause primitivamente o secondaria ad una malformazione extracardiaca (ernia diaframmatica, etc.).

Le dimensioni del cuore si possono ottenere misurando l'indice cardio-toracico, derivato dal rapporto tra la circonferenza cardiaca e la circonferenza toracica a fine diastole; i valori normali sono compresi tra 0,40 e 0,58 e quelli superiori sono indicativi di cardiomegalia.

I due atrii hanno approssimativamente la stessa grandezza (rapporto AD/AS = 1-1,2) e, mediante un'attenta osservazione dell'atrio sinistro, è possibile visualizzare lo sbocco di almeno 2 delle 4 vene polmonari. Il setto interatriale, in epoca fetale, si contraddistingue per la presenza di un'ampia soluzione di continuità, forame ovale, delimitata da una valvola che si introflette nell'atrio sinistro.

I due ventricoli hanno dimensioni pressoché sovrapponibili (rapporto VD/VS = 1-1,2) durante il primo e secondo trimestre ma, giunti al terzo trimestre di gestazione si ha una fisiologica prevalenza del ventricolo destro, svolgendo il ruolo del ventricolo sistemico, in epoca prenatale. Il ventricolo destro è situato anteriormente, in sede retrosternale, e presenta una evidente banda muscolare, la banda moderatrice, che si utilizza per definirne la morfologia. Il ventricolo sinistro ha sede posteriore, una forma più allungata e non presenta trabecolatura settale, identificativa della morfologia sinistra. Il setto interventricolare è composto da una *porzione membranosa*, piccola e situata a livello del piano di continuità che si interpone fra i lembi settali delle due valvole atrio ventricolari e la cuspidi non coronaria della valvola aortica, e da una *porzione muscolare* che si estende fino a raggiungere l'apice cardiaco. Le due valvole atrioventricolari devono presentare la stessa ecogenicità ed avere movimenti sincroni. Quando l'atrio destro si connette al ventricolo morfologicamente destro, definito dalla presenza della banda moderatrice, e l'atrio sinistro al ventricolo morfologicamente sinistro, si può parlare di connessione atrioventricolare concordante.

Terminata la scansione delle 4-camere, si passa a quella dell'asse lungo dei due ventricoli e del loro tratto di efflusso. Attraverso lo spostamento del trasduttore verso la spalla destra del feto, si può valutare il ventricolo sinistro, confermandone la morfologia, definendo il suo rapporto con l'aorta, e la presenza di continuità tra il setto interventricolare e la parete anteriore della aorta, permettendo l'esclusione di difetti interventricolari (DIV) con o senza "aorta a cavaliere" del DIV.

Spostando la sonda verso la testa del feto, si ottiene la scansione del ventricolo destro e, durante il passaggio da una scansione all'altra, si potrà valutare il normale incrocio delle due grandi arterie, escludendo quindi la presenza di

trasposizione dei grossi vasi; la arteria polmonare nasce dal ventricolo destro anteriormente all'aorta, decorre quindi a sinistra di quest'ultima, per poi dirigersi posteriormente ad essa ed incrociarla, quasi orizzontalmente, dando origine ai due rami polmonari, destro e sinistro.

Partendo dalla scansione delle quattro camere, inclinando il trasduttore cranialmente verso la spalla sinistra del feto, si ottiene la valutazione dell'asse corto cardiaco, grazie alla quale si può valutare la concordanza atrio-ventricolo-arteriosa destra, attraverso la visualizzazione di tutte le strutture del cuore destro. Questa sezione è inoltre la migliore per poter confrontare il calibro dell'aorta e della polmonare, essendo qui visibili contemporaneamente.

Sempre iniziando dalla scansione a 4 camere, spostando la sonda verso l'alto a livello della base del cuore, si ottiene la scansione 3-vasi, che consente di valutare contemporaneamente la posizione e il calibro della arteria polmonare, dell'aorta e della vena cava superiore. La arteria polmonare, che è posta a sinistra ed anteriormente rispetto all'aorta, si continua posteriormente nel dotto arterioso.

Muovendo la sonda leggermente verso l'alto, rispetto alla scansione dei 3 vasi, si visualizza, nella regione superiore del torace, l'arco aortico in sezione trasversa, posto al centro del torace di fronte alla colonna vertebrale; inclinando la sonda inferiormente e verso la sinistra, apparirà l'arco duttale. Giunti a questo punto, sarà quindi possibile confrontare il calibro dei due archi, la confluenza del dotto nell'aorta discendente ed infine, mediante l'uso del color doppler, si potrà visionare la direzione del flusso ematico all'interno del dotto.

Per quanto riguarda le scansioni longitudinali: dopo aver visionato la colonna vertebrale mediante una scansione in lunghezza, spostando la sonda lateralmente e verso destra, è possibile ottenere la sezione delle vene cave, le quali si trovano all'incirca sullo stesso piano longitudinale; tale sezione è utile per la valutazione della connessione veno atriale destra.

La scansione dell'Arco Aortico, ottenuta inclinando la sonda medialmente verso la sinistra del feto, permette di valutare l'arco aortico con l'emergenza dei vasi sovraortici (tronco brachiocefalico, carotide sinistra, succlavia sinistra), il tratto istmico e la aorta discendente.

Dalla precedente scansione, angolando il trasduttore cranialmente e verso la sinistra del feto, si visiona il dotto arterioso, che unisce l'arteria polmonare alla aorta discendente.

Attraverso l'utilizzo del monodimensionale, si ottiene un'immagine grafica, in funzione del tempo, delle strutture attraversate dal fascio di ultrasuoni. L'immagine che si acquisisce, consente una misurazione accurata delle dimensioni delle cavità, dello spessore delle pareti e dei movimenti di queste ultime.

Mediante l'utilizzo del color-Doppler è possibile ottenere una mappa in tempo reale della distribuzione dei flussi all'interno delle cavità cardiache. I flussi in avvicinamento alla fonte di ultrasuoni appariranno in rosso, mentre quelli in allontanamento saranno blu; inoltre, queste tonalità risulteranno progressivamente più brillanti con l'aumentare della velocità del flusso mentre, in presenza di flussi turbolenti, avremo un mosaico di colori, con l'aggiunta del giallo al rosso e al blu.

Attraverso il Doppler pulsato si ottiene un'immagine grafica, sempre tempo dipendente, della distribuzione del flusso all'interno di un singolo punto (volume campione). Per la valutazione dei flussi attraverso le valvole atrioventricolari, il volume campione viene posizionato subito al di sotto dei lembi delle valvole atrioventricolari; si ottiene così un'onda a M, composta da un picco minimo protodiastolico (onda E) e uno massimo in telediastole (onda A, che rappresenta il riempimento ventricolare durante la contrazione atriale). Inclinando leggermente la sonda verso la testa del feto e spostando il volume campione verso il setto interventricolare, si registra il flusso aortico sistolico, rappresentato da una curva con un unico picco centrale ad una velocità inferiore ad un metro al secondo; un flusso del tutto analogo a quest'ultimo, si registra in arteria polmonare, quando questa viene visualizzata in asse lungo. Spostando il volume campione da questa immagine, verso la parte distale dell'arco della polmonare, si evidenzia il flusso di sangue attraverso il dotto di Botallo.

La diagnosi di CC è stata effettuata sul primo o unico esame ecocardiografico (in caso di IVG), eseguito prima della nascita, ed eventualmente modificata sulla base dell'evoluzione della cardiopatia con il proseguirsi della gravidanza. Tutti i dati ecocardiografici misurati sono stati confrontati con i valori fisiologici.

Ogni diagnosi prenatale di CC è stata confermata alla nascita con un ecocardiogramma transtoracico effettuato sul neonato. È stato possibile analizzare il referto dell'autopsia, nei casi di morte intrauterina, per la conferma della diagnosi.

La valutazione dell'outcome postnatale è stata limitata al periodo neonatale, rappresentato dai primi 30 giorni di vita, ed ha incluso oltre che la mortalità e la morbidità, l'eventuale necessità di procedure chirurgiche o percutanee.

Le metodiche di analisi e campionature utilizzate sulla placenta sono state eseguite attenendosi al modello descritto nella review di Amsterdam [41], descritto nel precedente paragrafo, secondo il quale la placenta deve essere analizzata con una modalità multi-steps, partendo dalla analisi macroscopica delle sue diverse componenti, funicolo, membrane e disco coriale, spostandosi sulla ricerca di segni di mal-perfusione della componente materna (MVM) e fetale (MVF) della circolazione placentare, visionando quindi le anomalie dei villi, per concludere con l'analisi dei segni di infiammazione ed infezione placentare.

Per quanto riguarda lo studio macroscopico della placenta, è bene ricordare che le tecniche di fissazione del campione influenzano il peso complessivo dell'organo, determinandone un aumento dal 3% al 6% e che la valutazione delle dimensioni placentari prevede la misurazione della lunghezza, della larghezza e dello spessore murale dell'organo. La descrizione del funicolo deve includere il diametro, la lunghezza e il sito di inserimento, determinato misurando la distanza tra questo e il margine placentare più vicino; si deve anche considerare la presenza di stenosi e di anomalie della spiralizzazione del cordone.

Per eseguire una corretta analisi macroscopica dei componenti primari della placenta, sono necessari almeno 4 blocchi: uno che includa le membrane extra-placentali, dalla zona di rottura al margine placentare, due sezioni trasversali del cordone ombelicale, una dall'estremità fetale e un'altra a circa 5 cm dall'estremità di inserimento placentare, e altri due blocchi contenenti ciascuno una sezione a tutto spessore del normale parenchima placenta. Ad essi si deve aggiungere un blocco per ciascuna lesione che si riscontra, con annesso parenchima normale adiacente quando possibile, per un massimo di 3 blocchi aggiuntivi.

Con il termine MVF di alta qualità, vengono descritte quelle MVF di grave entità, probabilmente dovute all'ostruzione del flusso sanguigno fetale, indotto da molteplici condizioni (lesioni del cordone ombelicale, ipercoagulabilità, complicazioni della disfunzione cardiaca fetale, ecc.).

I dati indicativi di MVF, di cui si è tenuto conto, sono: la trombosi, i villi segmentali avascolari e la kariostasi stromale-vascolare dei villi.

Fra gli ulteriori possibili marcatori di MVF, sono stati ricercati: la deposizione vascolare della fibrina intramurale, l'obliterazione dei vasi staminali, la sclerosi fibromuscolare e l'ectasia vascolare.

Sono stati individuati due modelli di MVF:

- a basso grado, o MVF segmentale: descrive una lesione indicativa di un'occlusione trombotica dei villi coriali o staminali.
- ad alto grado o MVF globale: rappresenta una condizione tipicamente causata da un'ostruzione parziale del flusso ematico ombelicale con ectasia venosa, deposizione di fibrina intramurale e piccoli focolai di villi avascolari.

La maturazione villosa ritardata è prevalentemente osservata dopo la 36 settimana e raramente prima della 34 settimana di gestazione. Questa lesione è definita dalla presenza di una popolazione monotona di villi (almeno 10) con capillari posizionati in regione centrale e membrane vasculo-sinciziali diminuite. La diagnosi è stata fatta quando questa popolazione è stata riscontrata in almeno il 30% di un vetrino parenchimale a tutto spessore.

La villite ad eziologia sconosciuta prevede una diagnosi istologica eseguita mediante il campionamento di almeno 3 blocchi parenchimali.

Alla diagnosi segue la classificazione di queste villiti in basso o alto grado. Il basso grado è definito dalla presenza di infiammazione in almeno 10 villi contigui in uno stesso focus. L'alto grado è invece descritto come la presenza di focolai multipli, su più di una sezione, di cui almeno una mostra un'infiammazione che interessa più di 10 villi contigui.

La distinzione tra villite di basso grado e alto grado è importante in quanto esistono significative associazioni tra l'alto grado, la riduzione dell'accrescimento fetale (FGR) e le alterazioni dello sviluppo neurologico.

Le lesioni di basso grado sono state ulteriormente classificate in focali, se osservate in una sola diapositiva, e multifocali, quando presenti in più di una diapositiva. Anche le lesioni di alto grado sono state ulteriormente divise in irregolari, se caratterizzate da focolai multipli, e diffuse, quando vi erano coinvolti più del 30% di tutti i villi distali.

Lo studio delle anomalie genetiche e cromosomiche si è servito di diverse tecniche diagnostiche:

1. L'analisi standard del cariotipo [78], consiste nel semplice conteggio dei cromosomi e presenta una risoluzione di 3-5Mb. Questa tecnica ha permesso quindi l'identificazione di anomalie del numero (aneuploidie) e di struttura del cromosoma, quest'ultime ulteriormente divise in bilanciate (traslocazioni e inversioni) e non bilanciate. La metodica è basata sull'analisi di linfociti in coltura, arrestati in metafase o in profase. L'analisi in metafase è stata utilizzata soprattutto su quei bambini in cui si aveva un sospetto di sindrome da aneuploidie, come trisomie o monosomie.
2. L'ibridazione in situ (FISH)[79], sui cromosomi metafasici, ha permesso di diagnosticare mutazioni genomiche sia di tipo microdelezioni e duplicazioni, che di anomalie cromosomiche strutturali, in presenza però di un sospetto clinico. Questa tecnica prevede la creazione di specifiche sonde di sequenze di DNA complementari a quella in esame. Le sonde possono essere di tipo "Painting", ovvero che colorano l'intero cromosoma, o "a sequenza unica", quindi locus specifiche, usate soprattutto per le identificazioni di sindromi da microdelezioni e duplicazioni. Una delle sonde a sequenza unica più utilizzata nel contesto di una CC è la TUPLE1, grazie alla quale è stato possibile eseguire la diagnosi della Sindrome di DiGeorge (del22q11).
3. Array-CGH [80, 81] (Comparative Genomic Hybridization), si basa sul confronto fra il DNA del paziente e un DNA controllo, entrambi marcati con fluorocromi di diverso colore. Questa tecnica ha una sensibilità molto variabile, dipendente dalla densità con cui si va a porre la sonda nel vetrino, ed è in grado di raggiungere un massimo di 4Kb, grazie al quale può individuare delezioni intrageniche. Sapendo come il nostro genoma sia in grado di variare in modo fisiologico, è necessario interpretare i risultati ottenuti mediante un confronto con i dati depositati nei diverti database, come il DGV (Database of genomic variants) che raccoglie le variazioni registrate nei soggetti sani, o il DECIPHER, nel quale sono contenute le mutazioni associate a fenotipo patologico.

2.4 Modalità di classificazione dei feti con CC

I feti inclusi nello studio sono stati divisi in 5 gruppi a seconda del tipo di CC, rispettando una classificazione clinico-fisiologica che considera la compromissione emodinamica e l'outcome generale del paziente [23]: ostruzione aortica mono-ventricolare (Gruppo 1), ostruzione polmonare mono-ventricolare (Gruppo 2), bi-ventricolare emodinamicamente instabile (Gruppo 3), trasposizione delle grandi arterie (Gruppo 4), cardiopatie senza alterazioni emodinamicamente significative (Gruppo 5).

2.5 Dati utilizzati e Modalità di raccolta dati

Tutti i dati che sono stati utilizzati nello studio provengono dai database di tre reparti di un unico ospedale, l'IRCCS Istituto Giannina Gaslini di Genova: dal reparto di Cardiologia, abbiamo raccolto le informazioni sul paziente riguardanti il periodo fetale e neonatale, con un follow-up esteso al primo mese di vita, dal reparto di Anatomia Patologica sono stati ottenuti i dati sulle relative placente mentre, dal reparto di Ostetricia e Ginecologia, sono state raccolte le informazioni riguardanti la madre e la gravidanza. I dati raccolti sono stati inseriti in un'unica tabella Excel ed analizzati mediante due metodiche statistiche: descrittiva e inferenziale. Abbiamo eseguito un campionamento standardizzato sia per la raccolta dati che per la diagnosi placentare e fetale, garantendoci in questo modo una effettiva uniformità del campione. Abbiamo quindi suddiviso le variabili attestate in quattro gruppi: i dati del feto, della madre, del neonato e della placenta. Abbiamo preferito focalizzarci sulle variabili che presentano evidenze dimostrate in letteratura, e su quelle per le quali l'associazione con le CC, risulta essere un argomento dibattuto. Oltre a queste variabili, abbiamo inserito nel nostro studio anche quelle che, a seguito di un'analisi statistica approfondita, hanno presentato un risultato diverso da quello atteso.

2.6 Descrizione dei dati

Per quanto riguarda i dati della madre, abbiamo tenuto conto soprattutto del peso, in termini di BMI, definendo obeso se superiore a 30, sovrappeso se compreso fra 25 e 29.9, normopeso fra 18.5 e 24.9, sottopeso se minore di 18.5, e di alcune

malattie materne come il diabete mellito e i distiroidismi.

L'esame ecografico fetale ginecologico, da noi considerato per la raccolta dei dati, è stato eseguito durante il III trimestre di gravidanza e, di tutte le caratteristiche anatomico-funzionali in esso descritte, abbiamo utilizzato principalmente il valore del peso fetale stimato in centili (PSF).

Del neonato sono state valutate le seguenti variabili cliniche: peso alla nascita, eventuale associazione con una sindrome cromosomica o genetica o con anomalie strutturali extracardiache, necessità di sottoporsi un intervento cardio-chirurgico o percutaneo mediante cateterismo cardiaco durante il periodo neonatale (oltre che fetale).

Per IUGR abbiamo inteso sia il neonato di peso alla nascita inferiore al 5[^] che al 10[^]centile.

Sono stati utilizzati per l'analisi statistica anche i dati relativi ai pazienti che sono deceduti dopo la nascita o prima della nascita per IVG o MEF.

Per quanto concerne l'analisi della placenta, abbiamo tenuto conto del peso placentare, sempre in centili, delle anomalie vascolari, sia dei vasi amniocoriali che dei capillari dei villi staminali, e i reperti indicativi di malperfusione, della componente sia materna che fetale, della circolazione placentare, come emorragie ed infarti.

Del cordone abbiamo tenuto conto soprattutto della presenza di alterazioni dei vasi, come l'arteria ombelicale singola, della struttura, come presenza di edema, la spiralizzazione, l'epidermizzazione, e delle modalità di inserimento anomalo del cordone. Di quest'ultimo, abbiamo considerato normale la modalità di inserimento Centrale o Paracentrale, mentre Eccentrico, Velamentoso e Marginale sono stati identificati come anormali. Si definiscono Eccentriche tutte quelle inserzioni poste a 3 cm, o meno, dal margine del disco, Marginali quelle inserzioni poste sul margine del disco e Velamentose quelle inserzioni che si posizionano direttamente sulle membrane placentare, piuttosto che sul disco della placenta.

2.7 Tipo di analisi statistica

L'analisi statistica del nostro studio è stata attuata in due tempi: in primo luogo è stato eseguito uno studio descrittivo dei dati, volto a poter comprendere al meglio le variabili scelte per lo studio e a definire l'incidenza di queste nel contesto di

pazienti portatori di Cardiopatie Congenite; successivamente è stata attuata l'analisi statistica, mediante l'esecuzione del test esatto di Fisher, grazie al quale abbiamo potuto constatare se esistesse una significatività statistica fra le CC e la variabile presa in esame.

Analisi Descrittiva

L'analisi descrittiva consiste in una fase preliminare dell'elaborazione dei dati che, attraverso uno studio riepilogativo di questi, permette di rispondere alla domanda: "che cosa è successo?", e di preparare le variabili ad ulteriori analisi statistica.

Questo tipo di analisi si pone l'obiettivo di:

- Visualizzare i dati nel contesto corretto.
- Identificare le informazioni rilevanti nei dati.
- Valutare la qualità dei dati.
- Riconoscere le ipotesi e i limiti di quanto ricavato.

Questo tipo di analisi è utilizzato soprattutto per studiare dei comportamenti del passato e per capire in che modo questi potrebbero influenzare i risultati futuri.

Siccome l'analisi descrittiva si prefigge lo scopo di presentare i dati in un formato che può essere facilmente compreso da un ampio pubblico, è bene che questa sia:

- **Chiara:** una buona rappresentazione si deve focalizzare su cosa sta cercando di descrivere, cioè il fenomeno di interesse.
- **Dettagliata:** dovrebbe fornire dettagli completi sul fenomeno senza essere inutilmente complesso rispetto a concetti, dati, metodi o presentazioni.
- **Accurata:** l'analisi deve riflettere concetti chiave, incorporare una varietà di prospettive e approcci, non distorcere i dati e sarà accettato da ampie comunità di professionisti, imprenditori e responsabili politici perché riflette l'osservazione del mondo reale.
- **Ragionevole e comprensibile a tutti:** dovrebbe utilizzare concetti e metodi appropriati, facendo affidamento su misure pertinenti.

Il primo passaggio per eseguire questo tipo di analisi, è stato creare un database dei nostri dati in Excel. Successivamente, abbiamo dovuto eseguire una pulizia dei dati a nostra disposizione, andando ad uniformare alcune delle variabili rilevate, selezionare i dati mancanti ed eliminare quelli non accurati. Infine, mediante l'ausilio di tabelle Pivot in Excel, abbiamo calcolato l'incidenza, in percentuale, di ogni variabile, all'interno dei gruppi di CC, precedentemente esposti. Per poter eseguire un calcolo delle percentuali nel modo più accurato possibile, abbiamo tenuto conto del numero di dati mancanti per ogni variabile di ogni gruppo di CC, in questo modo, il totale dei pazienti dei singoli gruppi di CC, risulterà essere diverso a seconda della variabile in esame.

Questo tipo di studio ha il limite di essere solo un'analisi di superficie, di tipo osservazionale e, per tali motivi, risulta necessario implementarla con studi statistici più approfonditi.

Tutte le variabili inserite nel nostro studio sono state primariamente valutate con questo tipo di analisi e successivamente, è stata ricercata in queste una significatività statistica con il test di Fischer.

Test esatto di Fisher

Il test esatto di Fisher, definito anche “test di dipendenza e indipendenza di due variabili”, è un test statistico non parametrico, utilizzato per l'analisi di variabili nominali dicotomiche e in presenza di un campione piccolo.

Questo test, risulta più accurato del test chi-quadrato, quando i numeri attesi sono piccoli (<5).

Infatti, mentre il test del chi-quadrato ha validità asintotica, il presente test sarà, come dice il nome, sempre esatto, risultando dunque più idoneo ai fini del nostro studio.

Il test esatto di Fisher permette di accettare o rifiutare l'ipotesi nulla (H_0), secondo la quale: le proporzioni relative di una variabile sono indipendenti dai valori assunti dall'altra variabile. Quindi, l'accettare l' H_0 , vuol dire che le proporzioni fra le due variabili sono fra di loro indipendenti e le differenze osservate sono dovute esclusivamente dal caso.

Il modo in cui questo test è in grado di descrivere questo concetto è attraverso l'ottenimento del p Value. Questo valore, è stato calcolato per ogni confronto ed è stato stabilito un livello di significatività del 5% ($\alpha=0,05$).

Tutte le variabili esaminate tramite il test di Fisher sono state analizzate in relazione alle Cardiopatie; successivamente, mediante lo studio degli StandardizedResidual (SR), abbiamo valutato l'andamento della variabile dipendente all'interno dei singoli gruppi di CC. Nello specifico, abbiamo preso in esame le seguenti variabili: modalità di inserimento del cordone, numero di vasi nel cordone, presenza di edema cordonale, anomalie associate neonatali, sesso del bambino, peso della placenta, IUGR, BMI, intervento neonatale.

3. Risultati e discussioni

3.1 Generalità

Il nostro campione è costituito da un gruppo di 151 pazienti, tutti portatori di una CC con diagnosi prenatale, suddivisi in 5 gruppi, a seconda della fisiopatologia e delle conseguenze emodinamiche della cardiopatia di cui sono affetti. Ognuno dei singoli gruppi di Cardiopatie è composto da un diverso numero di pazienti in rappresentanza, a causa di una diversa incidenza dei vari tipi di CC diagnosticati nel periodo compreso fra il 2014 e il 2018 presso l'IRCCS Istituto Giannina Gaslini, per esattezza:

- il gruppo 1 è composto da 14 pazienti.
- il gruppo 2 vede solo 5 pazienti.
- il gruppo 3 è costituito da 64 pazienti.
- il gruppo 4 è formato da 19 pazienti.
- il gruppo 5 è il più numeroso, con 49 pazienti.

A causa dell'assenza di un campionamento con distribuzione uniforme nei diversi gruppi di cardiopatie, è stato necessario eseguire un'analisi statistica mediante l'uso del test esatto di Fisher.

Attraverso i database del G. Gaslini, è stato possibile raccogliere numerosi dati del feto, della madre e della placenta.

Con lo scopo di confermare alcuni risultati descritti in letteratura, abbiamo preferito concentrarci solo su alcune variabili specifiche.

Alterazioni del Cordone Ombelicale

Partendo dai dati anatomopatologici, ci siamo focalizzati sull'analisi delle anomalie del cordone, in termini di:

- modalità di anomalo inserimento cordonale nella placenta (AIC)
- alterazioni nel numero di vasi, come arteria ombelicale singola (AOS)
- Alterazioni macroscopiche, come l'edema del cordone

Abbiamo voluto analizzare la AIC, in relazione alle CC, in quanto è argomento discusso prevalentemente negli articoli più recenti della letteratura [71, 72, 73] e, come tale, risulta poco conosciuto. Contrariamente a quanto detto per la MIC, l'analisi della AOS è un argomento ben noto in letteratura [82, 83, 84]; come tale, abbiamo voluto includere la sua analisi all'interno del nostro studio, con lo scopo di confermare i risultati, precedentemente dimostrati, secondo i quali la presenza di AOS non è da considerarsi un fattore causativo di CC.

L'incidenza di AOS è un argomento molto dibattuto in letteratura: nel 1962 uno studio del Winnipeg General Hospital [85] ha dimostrato come l'incidenza di AOS, in un campione di 2500 neonati non patologici, fosse solo dello 0.2% dei neonati. Questo dato andava contro la letteratura precedente secondo la quale, l'incidenza di AOS nella popolazione generale, si aggirava intorno al 1% [86]. Nel 2005, uno studio Italiano [87], ha riscontrato la presenza di AOS nel 40% dei pazienti in esame, dimostrando come questa abbia quindi un'incidenza del 1.07% nella popolazione generale. Purtroppo, non avendo a disposizione un gruppo di controllo sano, non potremo fare chiarezza a proposito dell'incidenza di AOS nella popolazione generale.

Un altro argomento molto dibattuto in letteratura riguardante la AOS, è il fatto che la sua presenza determini un alto rischio per la patogenesi di malformazioni congenite, soprattutto cardiache e renali [88]. Secondo gli studi più recenti, non sarebbe sufficiente la sola presenza di AOS per portare ad un CC.

Per tale ragione, la presenza di AOS non dovrebbe essere considerata come un fattore causativo di CC ma, come un semplice fattore aggiuntivo di rischio per patologie congenite; sulla base di questo, ad oggi non risulta necessario eseguire un'ecocardiografia fetale specialistica in donne che presentano come unico fattore di rischio per CC la presenza di AOS [89]. In questo studio, è nostra volontà far chiarezza su questo tema, verificando quindi che la sola presenza di AOS NON possa determinare la patogenesi delle CC, confermando così i moderni studi.

In Letteratura viene descritta una importante associazione fra le anomalie angiogeniche della placenta e le CC [23, 67, 68, 69], mediante lo studio di parametri come PIGF materno o la valutazione dei flussi ombelicali attraverso la tecnica Doppler.

Vista l'importanza della associazione fra CC e le alterazioni vascolari, abbiamo ritenuto necessario studiare questa dipendenza all'interno del nostro campione, procedendo però in modo leggermente diverso dagli studi precedentemente descritti. Invece di focalizzarci sulle anomalie angiogeniche, abbiamo voluto concentrarsi sulle alterazioni macroscopiche del cordone, essendo questo un argomento poco dibattuto in letteratura.

Il nostro obiettivo è quello di dimostrare se la presenza di alterazioni macroscopiche del cordone siano associate alle CC e, conseguentemente se queste condizioni patologiche possano essere la causa di un'alterazione dell'emodinamica cordonale, responsabile della patogenesi delle CC stesse. Abbiamo quindi deciso di procedere in questa direzione, studiando le alterazioni macroscopiche del cordone, ritenendole sia un argomento innovativo, sia, se risultasse vero quello che ipotizziamo, un utile marcatore di screening. Infatti, essendo queste alterazioni diagnosticabili attraverso l'esame ecografico, potrebbero essere aggiunte alla ricerca del PIGF per ampliare lo screening delle CC. Per quanto concerne le anomalie macroscopiche del cordone, abbiamo analizzato circa 18 variabili, relazionate alle CC, fra queste, solo la presenza di edema del cordone ha mostrato una significatività statistica, meritando quindi una menzione speciale. Questa condizione viene definita, da un punto di vista macroscopico, come la presenza di un eccesso di gelatina di Warthon, sostanza che svolge fisiologicamente il ruolo di protezione dei vasi del cordone ma, quando è presente in maniera eccessiva, viene definita appunto Edema del cordone.

Da un punto di vista anatomopatologico, si può riconoscere l'edema in epoche gestazionali precoci, all'interno del cordone primordiale, conseguentemente, non è da ritenersi una condizione esclusiva del Cordone Definitivo.

Alterazione del Peso

Dopo aver analizzato le variabili descrittive le alterazioni del cordone, ci siamo orientati verso lo studio del peso della placenta correlato alle CC, argomento fortemente discusso in letteratura.

Molteplici studi moderni riferiscono la presenza di una associazione fra la placenta piccola e sottopeso e i pazienti con CC [23, 65, 67]. Il razionale dietro questi studi è che: essendo la placenta il fornitore di sostanze nutritive e ossigeno: tanto più quest'organo è piccolo, tanto meno sostanze arriveranno al feto e quindi, tanto meno questo potrà svilupparsi.

Essendo questo uno dei pochi temi trattati dalla letteratura, nell'ambito della associazione fra la placenta e le CC, abbiamo ritenuto necessario eseguire questa indagine all'interno dei nostri dati. Sempre rimanendo nel contesto del peso, siamo andati a ricercare le associazioni fra il bambino IUGR e le CC e, fra le cardiopatie e il BMI materno, con lo scopo di confermare i dati descritti negli studi precedenti. Secondo un importante studio [90], i pazienti con una diagnosi prenatale per CC mostrano un rischio di IUGR tre volte superiore alla norma; tale il rischio raddoppia per i pazienti affetti da cardiopatia Mayor. Concordando con la letteratura, abbiamo definito l'IUGR il peso inferiore, non solo al 5 centile ma, anche al 10 centile.

Lo studio del BMI materno, nel contesto di una CC, è un argomento di estrema importanza in letteratura perché: se fosse dimostrata una correlazione fra le due variabili, si potrebbe definire l'obesità come un fattore di rischio per le CC e quindi, si avrebbe la possibilità di agire con una prevenzione primaria sulla patogenesi di queste alterazioni congenite. Ad oggi il BMI obeso materno (>30) viene ritenuto un fattore di rischio per alcune CC, determinando un aumento della prevalenza di specifiche cardiopatie come: anomalie del tronco aortico, persistenza del tronco arterioso e difetti del setto interatriale [91]. Partendo da questi presupposti, abbiamo ritenuto necessario ricercare la relazione fra BMI e CC all'interno del nostro campione.

Purtroppo, molte informazioni sul BMI delle madri in esame sono a noi sconosciute, a causa di un'impossibilità di reperire in tempi brevi i dati anamnestici delle madri che non sono state seguite di Ginecologi del G. Gaslini. Quindi, avendo questa importante mancanza di dati, abbiamo preferito non prendere in considerazione i risultati ottenuti dalle nostre analisi perché, molto probabilmente, sfalsati dalla anomalia del campione. Piuttosto, concordiamo con la Letteratura nel ritenere questo studio essenziale e, per tale ragione, ci poniamo l'obiettivo futuro di completare il nostro Database, mediante l'inserimento di tutte le informazioni anamnestiche riguardanti il peso materno.

Variabili Fetali e Post-Natali

In ultima analisi, abbiamo concentrato il nostro studio sull'analisi delle variabili che riguardano esclusivamente il bambino, così da poter completare il nostro percorso, arrivando a descrivere l'outcome neonatale in termini di necessità di sottoporsi ad un intervento chirurgico, o una cateterizzazione, nell'immediato post-natale e alla presenza di anomalie extracardiache associate.

In primis, abbiamo ricercato come si distribuisce il Genere del bambino all'interno delle CC. Secondo lo studio "Boy:girl ratio in children born with different forms of cardiac malformation: a population-based study" del 1994, l'incidenza generale delle CC è pressoché identica in entrambi i sessi ma, la distribuzione delle specifiche patologie cardiache presenta un andamento differente nei due generi. Interessati dalla letteratura [92], abbiamo voluto ricercare questa associazione all'interno del nostro studio.

Successivamente, ci siamo concentrati sullo studio delle anomalie extracardiache associate alle CC, decidendo di considerare soprattutto quelle per le quali la letteratura ha già dimostrato una correlazione con le CC [93, 94]:

- Anomalie del SN: ipoplasia del verme cerebellare, spina bifida [95], mielomeningocele, encefalocele, scafomegalia, macro/microcrania, calcificazioni dei nuclei della base, neuroblastoma [96]
- Anomalie del Massiccio facciale: labiopalatoschisi [97], microftalmia, assenza dell'osso nasale,

- Anomalie Gastroenteriche: anomalie di numero, o conformazione, della milza, ectasie piloduodenali, atresia esofagea e/o duodenale, fistola tracheoesofagea [98], ano imperforato,
- Anomalie Genitourinarie: idronefrosi, stenosi ureterale, displasia cistica renale, rena a ferro di cavallo [99], monorene, insufficienza renale, vescicomegalia, ipospadia, genitali ambigui,
- Anomalie vascolari: aneurisma mesenterico, aneurisma della vena di Galeno [100]
- Anomalie respiratorie: idrotorace, ipertensione polmonare primitiva [101], laringomalacia
- Altre anomalie: surrene ectopico, ipoplasia timica, anomalie scheletriche [102], iperinsulinemia, ipotiroidismo [103], ernia diaframmatica,

Prendendo atto della grande variabilità di queste anomalie, abbiamo preferito considerarle tutte come un'unica variabile, così da poter studiare, non tanto l'incidenza della singola anomalia del contesto delle Cardiopatie, argomento già espresso dalla Letteratura precedente, ma il loro andamento generale nei diversi gruppi di CC.

L'ultima analisi è stata eseguita mediante l'osservazione della variabile "necessità da parte del neonato di sottoporsi ad intervento chirurgico/ cateterismo interventistico, nell'immediato post-natale" nel contesto delle CC.

Tutti gli interventi di cui parleremo, sono stati eseguiti esclusivamente presso il G. Gaslini, nel periodo immediatamente successivo alla nascita del bambino.

Il motivo per il quale abbiamo voluto valutare questa variabile è stata quella di voler osservare la sua distribuzione nei diversi gruppi di CC, esaminando quindi quali di questi siano dipendenti dalla necessità di intervento post-natale e discutendo sul perché.

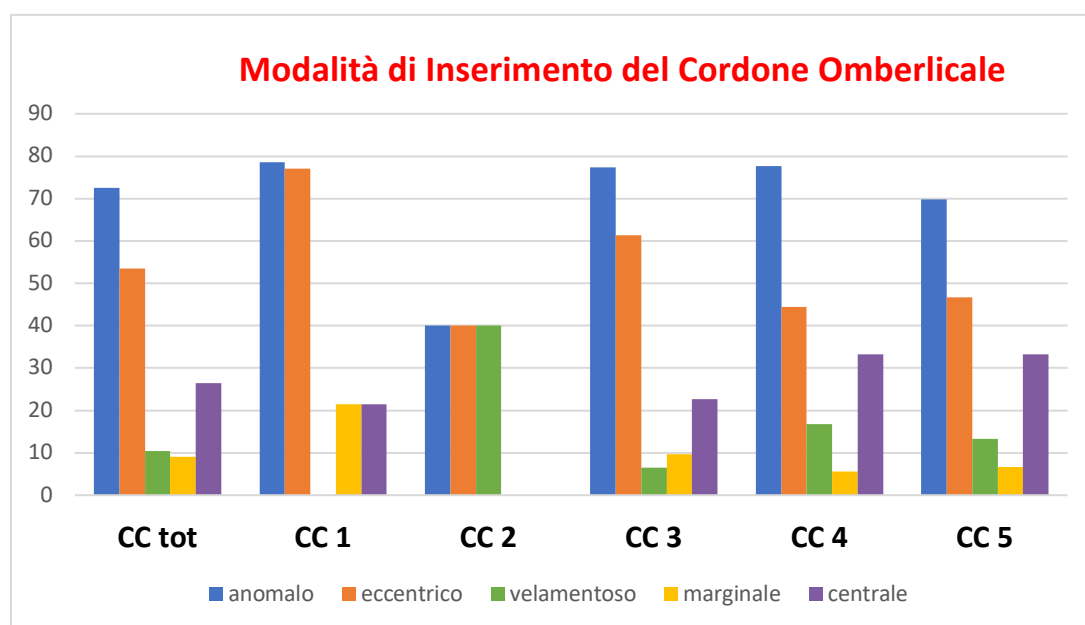
3.2 Anomalo Inserimento del Cordone (AIC) e CC

È stata eseguita un'iniziale analisi descrittiva per valutare l'incidenza generale di anomalo inserimento del cordone (AIC) nei pazienti cardiopatici. Da questo studio, si evince che (Tabella 1-2): il 72.5% di tutti i pazienti cardiopatici,

presenta una modalità anomala dell'inserimento del cordone, di cui il 53.5 % è rappresentato dalla modalità Eccentrica. Analizzando i risultati nei singoli gruppi di CC, possiamo vedere come: nel Gruppo 1 vi siano il 78.6% dei soggetti con inserimento anomalo, di cui il 57.1% Eccentrico, nel Gruppo 3 abbiamo un'incidenza generale del 77.4%, di cui il 61.3% eccentrico, mentre il Gruppo 4 e 5 presentano un'incidenza e una modalità eccentrica pressoché uguale (66.7% per il gruppo 4, con un 44.4% di eccentrico, 69.8% per il gruppo 5, con il 46.7% di eccentrico). Solo il Gruppo 2 non presenta un'incidenza >50% di AIC, infatti lo ritroviamo solo in un 40% dei soggetti.

	anomalo	eccentrico	velamentoso	marginale	non anoma
CC tot	72.5 %	53.5 %	10.4 %	9.0 %	26.4 %
CC 1	78.6 %	57.1 %	0.0 %	21.4 %	21.4 %
CC 2	40.0 %	40.0%	40.0%	0.0%	0.0%
CC 3	77.4%	61.3%	6.5%	9.7%	22.6%
CC 4	77.7%	44.4%	16.7%	5.6%	33.3%
CC 5	69.8%	46.7%	13.3%	6.7%	33.3%

Tabella 1 e 2: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*



Avendo riscontrato un'incidenza così alta in quasi tutte le cardiopatie, abbiamo voluto ricercare una significatività statistica fra la CC e la AIC, mediante l'esecuzione del Test di Fisher.

I risultati ottenuti da questa analisi (Tabella 3), non hanno dimostrato alcuna significatività statistica di dipendenza fra le CC e le AIC ($p=0.379$).

Quello che si evince dallo studio di questi risultati è che: le CC presentano una frequente incidenza di modalità anomala generale dell'inserimento del cordone, ma questa, non essendo stata confermata la dipendenza delle variabili dal test di Fisher, non è sostenuta da alcuna validità statistica. Analizzando l'andamento degli Standardized Residual (SR) (Tabella 4) dei gruppi che avevano mostrato un'incidenza maggiore, ovvero il Gruppo 1,3 e 4, possiamo vedere come solo il Gruppo 3 nella modalità eccentrica, presenti una discrepanza fra i valori attesi e quelli misurati: abbiamo contato 38 pazienti con AIC eccentrico, mentre ce ne saremmo aspettati solo 32.6;

Tabella 3: *descrizione dell'analisi di Fisher e del p value*

Inserimento Cordone	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	4.084	0,379

Tabella 4: *descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC*

		Centrale	Eccentrico	Marginale	Velamentoso
CC 1	Contati	1	8	3	0
	Attesi	1.9	7.1	1.2	1.2
	SR	-0.7	0.3	1.6	-1.1
CC 2	Contati	1	2	0	0
	Attesi	0.7	2.5	0.4	0.4
	SR	0.4	-0.3	-0.7	-0.7
CC 3	Contati	7	38	6	4
	Attesi	8.9	32.6	5.5	5.5
	SR	-0.6	0.9	0.2	-0.6
CC 4	Contati	4	8	0	3

	Attesi	2.6	9.7	1.6	1.6
	SR	0.8	-0.5	-0.5	1.1
CC 5	Contati	8	21	3	6
	Attesi	6.8	25	4.2	4.2
	SR	0.5	-0.8	-0.6	0.9

Non essendo stata dimostrata alcuna dipendenza fra le variabili nei nostri risultati, ci troviamo in disaccordo con quanto dimostrato dalla precedente letteratura [71,104] ed escludiamo che la presenza della variabile AIC possa determinare un rischio aggiuntivo nella patogenesi dalle CC. Dissentiamo quindi dal ritenere necessario l'implementazione delle tecniche di screening ecografiche fetali mirate alla ricerca della modalità di inserimento del cordone, in quanto non riteniamo vi sia alcuna associazione fra le due variabili. Per concludere, essendo l'incidenza di AIC alquanto alta nel contesto di pazienti cardiopatici, riteniamo necessario ampliare il nostro studio con l'inserimento di un gruppo di controllo sano. In questo modo, se l'AIC si dovesse presentare altrettanto frequentemente anche nel controllo sano, non solo si confermerebbero i risultati ottenuti in questo studio ma si potrebbe arrivare a considerare l'AIC come una semplice variante fisiologica.

3.3 Arteria Ombelicale Singola (AOS) e CC

Alla luce di quanto pubblicato precedentemente in letteratura, abbiamo ritenuto

AOS	
CC tot	9%
CC 1	7,10%
CC 2	60%
CC 3	12,50%
CC 4	5,90%
CC 5	0%

importante eseguire lo studio statistico di associazione fra le CC e la presenza di AOS, all'interno del nostro campione di soggetti esclusivamente cardiopatici.

Quello che si evince dai risultati dell'analisi descrittiva (Tabella 6-7) è che il 9% dei pazienti totali (151) presenta AOS di cui, il 7.1% fa parte del Gruppo 1, il 12.5% nel Gruppo 3,

il 5.9% si trova nel Gruppo 4; per quanto riguarda il Gruppo 2 abbiamo un 60%, mentre nel Gruppo 5, nessun paziente presenta questa variabile.

Tabella 6-7: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*

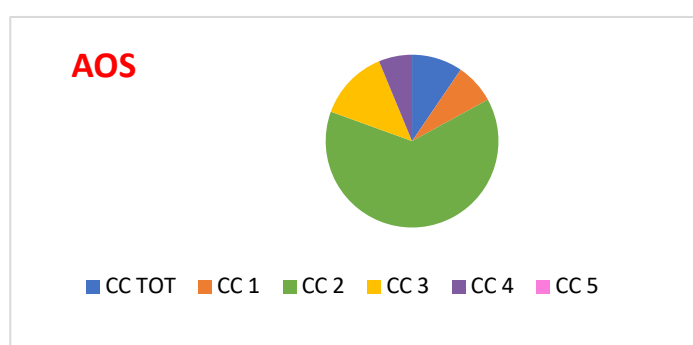
Da questi risultati si evince che l'incidenza di AOS nella popolazione di cardiopatici è nettamente superiore a quella della popolazione generale (circa del 1%) e che la presenza di AOS non pare essere associata alle cardiopatie descritte nel Gruppo 5.

Avendo riscontrato questi interessanti risultati, abbiamo deciso di proseguire lo studio statistico con il test di Fischer (Tabella 8). Il risultato ottenuto, non mostra però alcuna dipendenza fra le due variabili ($p=0.117$), conseguentemente non è stata dimostrata alcuna significatività statistica.

Tabella 8: *descrizione dell'analisi di Fisher e del p value*

AOS	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	6,322	0,117

Alla luce di quanto riscontrato, ci troviamo concordi con la letteratura nel sostenere che la sola presenza di AOS, come unico fattore di rischio per le CC, non sia statisticamente significativa da poter determinare la patogenesi della cardiopatia. Concordiamo ulteriormente con la letteratura [105] nell'escludere la necessita di uno studio ecocardiografico specialistico se, come unica indicazione vi è la presenza di AOS. Contrariamente, non possiamo escludere che la presenza di AOS sia comunque un fattore di rischio aggiuntivo per le CC, soprattutto avendo riscontrato una discrepanza di incidenza fra la popolazione sana e i



cardiopatici, crediamo quindi che lo studio ecocardiografico debba essere attuato solo in quei pazienti che presentino ulteriori fattori di rischio, aggiuntivi alla presenza

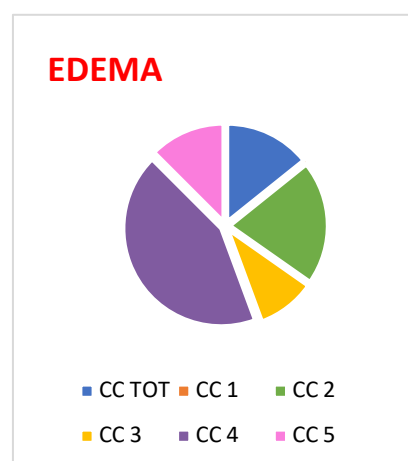
di AOS, per le CC [106].

3.4 Edema del Cordone e CC

Dai risultati dell'analisi descrittiva (Tabella 9-10), riscontriamo un'incidenza complessiva dell'edema del cordone, dei feti affetti da CC, solo del 13.9%, di cui la percentuale più elevata (42.1%) è presente nel Gruppo 4.

Tabella 9-10: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*

Edema Cordone	
CC tot	13.9%
CC 1	0%
CC 2	20%
CC 3	9.4%
CC 4	42.1%
CC 5	12%



L'analisi del test di Fisher (Tabella 11), eseguita secondariamente, ha riconosciuto un'inaspettata significatività statistica fra la variabile CC e la presenza di edema del cordone, con un p value=0.096, che ci permette di dimostrare una dipendenza, statisticamente significativa, fra le due variabili; infatti, la distribuzione della presenza o meno di edema non rispetta la proporzione numerica che vi è tra i diversi gruppi, portandoci ad escludere che questa distribuzione sia solo merito del caso.

Tabella 11: *descrizione dell'analisi di Fisher e del p*

EDEMA	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	13,1	0,096

Come si evince dalla tabella, dallo studio dei Standardized Residual (SR) (Tabella 12), possiamo vedere come sia il Gruppo 4 che l'1 si discostino di più dal valore atteso. Precisamente, mentre nel Gruppo 4 abbiamo riscontrato un numero maggiore di pazienti con edema rispetto a quello atteso, il discorso opposto può essere fatto per il Gruppo 1, nel quale vediamo meno pazienti con edema di quanti ce ne saremmo aspettati.

In particolare, sembrerebbe che la presenza di edema del cordone aumenti la probabilità di avere la TGA, CC appartenente al Gruppo 4, al contrario la presenza dell'edema del cordone, riduce la probabilità di avere CC del Gruppo 1. Dai nostri risultati si evince che, la presenza di edema del cordone, potrebbe determinare dei fattori aggiuntivi di rischio per le CC, in particolare per il Gruppo 4, ovvero, la TGA mentre, la presenza di edema sembrerebbe determinare fattori protettivi per le CC del Gruppo 1, le monoventricolari con ostruzione al flusso sistemico.

		Edema Assente	Edema Presente
CC 1	Contati	14	0
	Attesi	12.1	1.9
	SR	0.6	-1.4
CC 2	Contati	4	1
	Attesi	4.3	0.7
	SR	-0.1	0.4
CC 3	Contati	58	6
	Attesi	55.1	8.9
	SR	0.4	-0.1
CC 4	Contati	11	8
	Attesi	16.4	2.6
	SR	-1.3	3.3
CC 5	Contati	43	6
	Attesi	42.2	6.8

	SR	0.1	-0.3
--	----	-----	------

Tabella 12: *descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC*

Considerando il solo sviluppo embriologico feto-placentare, è improbabile che sia l'edema del cordone definitivo ad essere un fattore di rischio delle CC, avendo il cordone uno sviluppo più tardivo del cuore; infatti, mentre il cordone definitivo si svilupperà nel periodo compreso fra il terzo e il sesto mese, la formazione del setto aortopolmonare (grazie al quale otterremo la completa separazione del cono di efflusso aortico da quello polmonare e che, se commettesse degli errori, potrebbe essere causativo di CC come il TGA) avverrà già alla 5 settimana di gestazione. Quello che però può succedere è che, la presenza di edema del cordone sia antecedente al suo sviluppo terminale, come spiegato all'inizio del paragrafo, e quindi, che sia in grado di influenzare la patogenesi di CC. Per tale ragione, considerando anche l'assenza di studi in letteratura su questo specifico argomento, riteniamo necessario portare avanti il nostro studio mediante l'inserimento di un gruppo di controllo sano e mediante la valutazione ecografica del cordone, da eseguirsi prima del terzo mese di gestazione. In questo modo sarà possibile valutare sia l'incidenza di edema del cordone nella popolazione generale, che la eventuale presenza di questo nel cordone non ancora definitivo, permettendoci così di confermare la tesi da noi sostenuta, secondo la quale l'edema del cordone determini un fattore aggiuntivo di rischio per determinate CC.

3.5 Peso Placentare alla nascita e CC

Peso Placenta	
CC tot	53.3%
CC 1	30%
CC 2	80%
CC 3	60%
CC 4	46.2%
CC 5	50%

Per quanto riguarda l'analisi descrittiva (Tabella 13-14), l'incidenza di una placenta alla nascita, con peso < al 5 centile è stata ritrovata nel 53.3% di tutti i feti affetti da CC. Andando nel dettaglio, osserviamo che l'80% dei feti nel Gruppo 2 presenta questa caratteristica, nel Gruppo 3, il 60%, mentre la percentuale più bassa si trova associata al Gruppo 1 (30%).

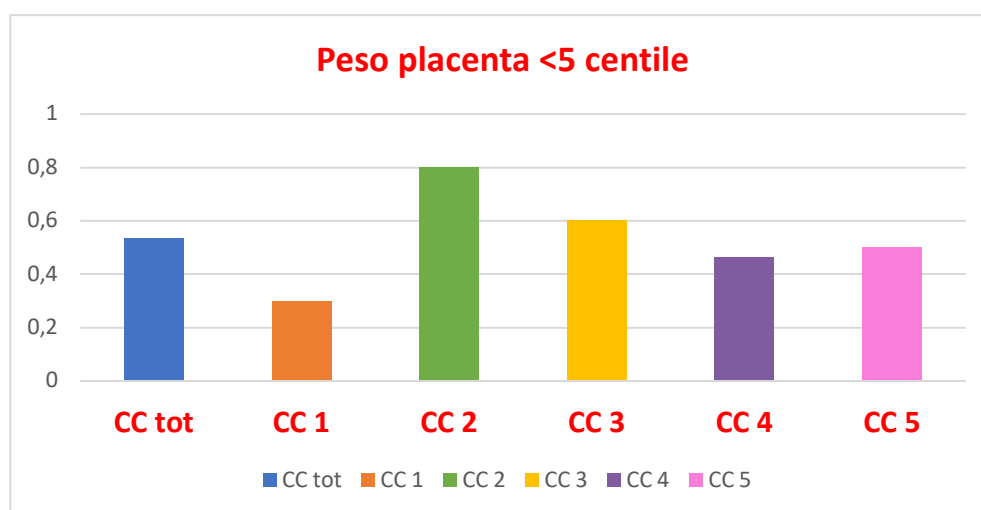


Tabella 13-14: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*

Avendo ottenuto un'incidenza generale maggiore del 50% e facendo fede ai risultati ottenuti dalla letteratura precedente, abbiamo optato per continuare l'analisi statistica su queste due variabili, eseguendo il test di Fisher (Tabella 15).

PESO PLACENTA	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	5,749	0,681

Tabella 15: *descrizione dell'analisi di Fisher e del p*

Contrariamente a ciò che ci aspettavamo, il test non ha mostrato alcuna dipendenza fra la variabile peso placentare <5 centile e le CC ($p=0.681$), portandoci a concordare con alcuni articoli in letteratura i quali, escludono la teoria secondo la quale esisterebbe una associazione fra la placenta sottopeso e le CC [71].

Ulteriormente interessante è il fatto che, secondo alcuni studi [23] il basso peso placentare si assocerebbe ad una specifica cardiopatia, ladTGA. Dai risultati della nostra analisi descrittiva, questa cardiopatia congenita, rappresentata nel Gruppo 4, presenta un'incidenza di basso peso placentare solo del 46,2% e, attraverso lo studio dei SR (Tabella 16), i valori attesi e quelli misurati nel Gruppo 4, sono pressoché gli stessi anzi, risultano essere lievemente minori i pazienti affetti da dTGA con peso placentare basso, rispetto a quelli che ci saremmo aspettati

(count= 6, expected=6.9); per tale motivo, riteniamo improbabile che il basso peso possa essere il fattore causativo del TGA e, alla luce dei nostri risultati, escludiamo qualunque tipo di dipendenza statistica fra le CC e il basso peso placentare, astenendoci dal ritenere il peso placentare come un fattore di rischio aggiuntivo per la patogenesi delle CC.

		Peso Placenta normale	Peso Placenta <5 centile
CC 1	Contati	4	3
	Attesi	2.8	5.3
	SR	0.7	-1.0
CC 2	Contati	1	4
	Attesi	1.4	2.7
	SR	-0.3	0.8
CC 3	Contati	11	27
	Attesi	12.6	24
	SR	-0.5	0.6
CC 4	Contati	5	6
	Attesi	3.6	6.9
	SR	0.7	-0.4
CC 5	Contati	9	17
	Attesi	9.5	18.1
	SR	-0.2	-0.3

Tabella 16: *descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC*

3.6 Intrauterine Growth Restriction (IUGR) e CC

Attraverso lo studio dei risultati ottenuti mediante l'esecuzione dell'analisi descrittiva (Tabella 17-18), possiamo vedere come l'incidenza dello IUGR nelle CC di tutti i gruppi sia del 21.9%, decisamente superiore a quella della popolazione generale che va dal 3 al 7% [107]. Questa incidenza presenta una percentuale massima nel Gruppo 1 (28.2 %) e una minima nel Gruppo 2, con uno 0% dei soggetti IUGR. Il fatto che non vi sia alcun paziente IUGR nel Gruppo 2, uno dei principali gruppi di CC Major, ci porta a pensare che l'ipotesi di Merriman et al. [108], secondo la quale l'IUGR sia maggiormente associato a CC maggiori, non possa essere corretta.

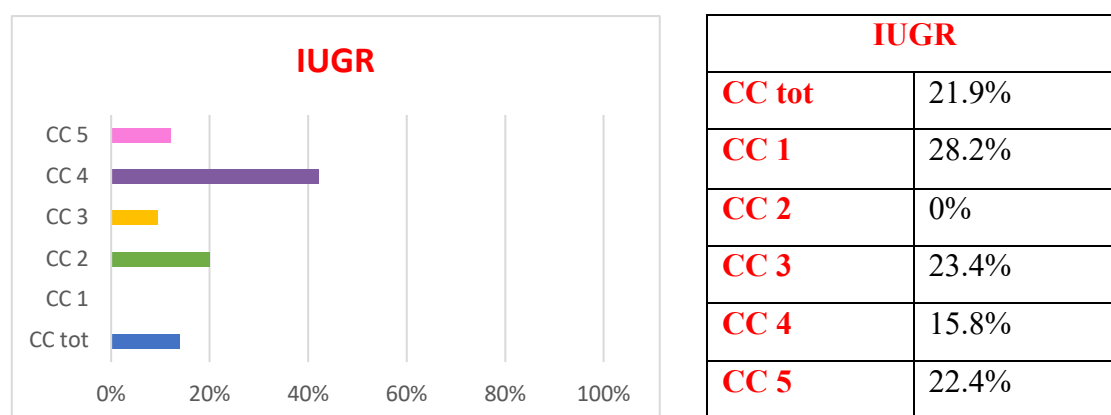


Tabella 17-18: *rappresentazione dell'analisi descrittiva*

Per completare il nostro studio, è stato attuato Il test di Fisher su queste due variabili (Tabella 19). I risultati non dimostrano alcuna dipendenza statistica fra le CC e l'IUGR ($p=0.595$), portandoci quindi ad escludere il fatto che esista un'associazione fra queste due variabili.

Non solo, attraverso la valutazione dello SR (Tabella 20) riferito al Gruppo 2, vediamo come nessun paziente avesse IUGR, nonostante ce ne aspettassimo almeno 1.3. Grazie a questo risultato, possiamo escludere la teoria sostenuta dall'articolo precedentemente citato, ritenendo improbabile la presenza di un'associazione fra IURG e CC e, soprattutto che questa sia maggiormente presente nelle Cardiopatie Mayor.

IUGR	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	2,808	0,595

Tabella 19: *descrizione dell'analisi di Fisher e del p*

		IUGR assente	IUGR presente
CC 1	Contati	10	4
	Attesi	10.5	3.5
	SR	-0.1	0.3
CC 2	Contati	5	0
	Attesi	3.7	1.3
	SR	0.7	-1.1
CC 3	Contati	45	19
	Attesi	47.9	16.1
	SR	-0.4	0.7
CC 4	Contati	16	3
	Attesi	14.2	4.8
	SR	0.5	-0.8
CC 5	Contati	37	12
	Attesi	36.7	12.3
	SR	0.1	-0.1

Tabella 20: *descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC*

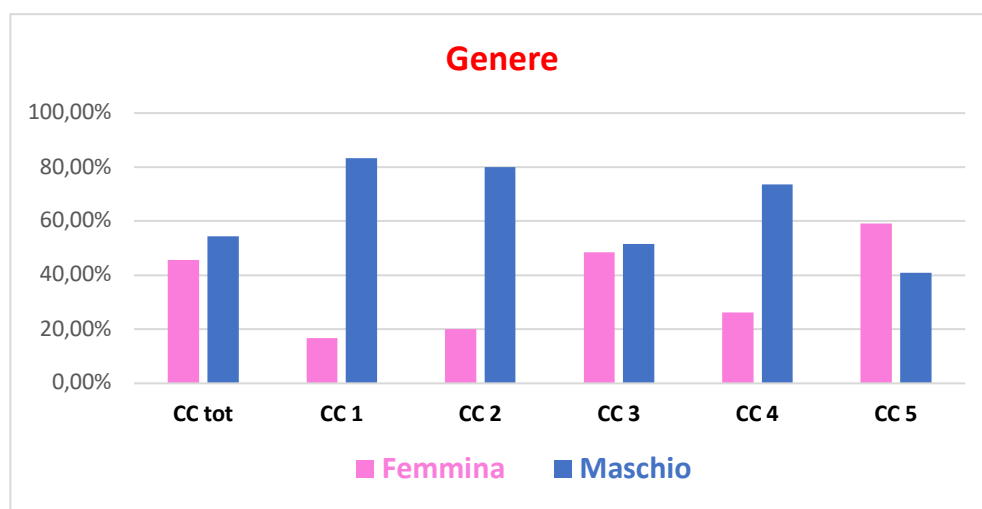
3.7 Genere Sessuale e CC

Genere Maschile	
CC tot	54.4%
CC 1	83.3%
CC 2	80%
CC 3	51.3%
CC 4	73.7%
CC 5	40.8%

Mediante i risultati ottenuti dall'analisi osservazionale (Tabella 21, 22), possiamo vedere che il 54.4% dei pazienti cardiopatici sia di genere maschile. Andando nel dettaglio, il sesso maschile si presenta nel 83.3% nel Gruppo 1, nel 80% nel Gruppo 2, in un 51.3% del Gruppo 3 e nel 73.7% dei soggetti appartenenti al Gruppo 4.

Soltanto il Gruppo 5, rappresentato dalle CC minor, presenta un'incidenza femminile più alta di quella maschile (59.2%).

Tabella 21,22: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*



Il test esatto di Fisher (Tabella 22) ha confermato il sospetto del rapporto di dipendenza fra il genere e le CC, con un $p\text{ value}=0.015$. Questo risultato ci permette di capire come, il sesso del bambino sia dipendente dal gruppo di cardiopatie in cui si trova il paziente. Infatti, la distribuzione della variabile genere, maschi e femmine, non rispetta la proporzione tra i diversi gruppi, mostrandosi con un andamento differente rispetto a quello previsto dall'ipotesi

nulla. Questo risultato ci permette di escludere che l'andamento della variabile sia dato dal caso, bensì che vi sia una validità statistica.

GENERE	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	11,788	0,015

Tabella 22: descrizione dell'analisi di Fisher e del p

Andando più nel dettaglio, attraverso l'analisi dei SR (Tabella 23), possiamo vedere come il numero di pazienti di sesso maschile sia più alto rispetto a quello che ci saremmo aspettati, valore atteso, nei Gruppi 1, 2, e 4. Per quanto riguarda il Gruppo 3, l'analisi dei SR dimostra come in questo gruppo siano state contate più femmine, rispetto a quello che ci saremmo aspettati (30 contati, 28 attesi). Il genere femminile mostra una notevole dipendenza con il gruppo 5, con un valore atteso nettamente inferiore a quello misurato (22 a 29).

		FEMMINA	MASCHIO
CC 1	Contati	2	10
	Attesi	5.5	6.5
	SR	-1.5	1.4
CC 2	Contati	1	4
	Attesi	2.3	2.7
	SR	-0.8	0.8
CC 3	Contati	30	32
	Attesi	28.3	33.7
	SR	0.3	-0.3
CC 4	Contati	5	14
	Attesi	8.7	10.3
	SR	-1.2	1.1
CC 5	Contati	29	20

	Attesi	22.3	26.7
	SR	1.4	-1.3

Tabella 22: *descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC*

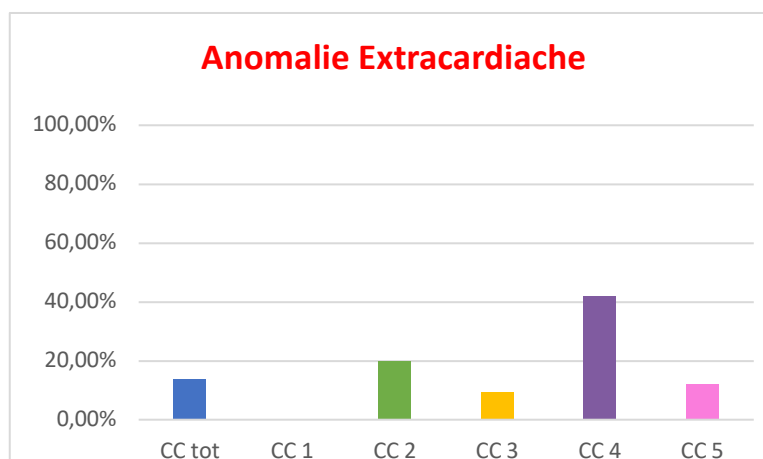
Dai risultati di questa analisi possiamo discutere sul come il sesso femminile possa essere un fattore protettivo per la patogenesi di CC Mayor, essendo prevalentemente rappresentato nel contesto di difetti congeniti di tipo Minor, o comunque biventricolari, oppure di come essere maschi determini un rischio aggiuntivo alla patogenesi delle CC Mayor. Sicuramente uno studio genetico su i cromosomi sessuali, o sullo sviluppo dei dotti di Muller e Wolff, potrebbe in futuro fornirci informazioni aggiuntive sul perché e il come questi eventi arrivino a verificarsi.

3.8 Anomalie Extracardiache Associate e CC

Anomalie Extracardiache	
CC tot	34.4%
CC 1	7.1%
CC 2	0%
CC 3	42.2%
CC 4	5.3%
CC 5	46.9%

Dai risultati dell'analisi descrittiva (Tabella 23, 24) dei dati, risulta che il 34.4% di tutte le cardiopatie sia associata ad anomalie extracardiache; interessante è il fatto che, il 46.9% si trovi nel gruppo 5, CC minor, il 42.2% nel gruppo 3 e lo 0% nel gruppo 2.

Tabella 23, 24: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*



Dallo studio dei risultati ottenuti con il test di Fisher (Tabella 24), capiamo come la presenza, o l'assenza, di Anomalie extracardiache sia dipendente dal gruppo di appartenenza delle CC ($p=0.000$), infatti la distribuzione della variabile "presenza o meno di anomalia" non mostra un andamento proporzionale nei diversi gruppi di CC.

Anomalie Extracardiache	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	20,338	0,000

Tabella 24: *descrizione dell'analisi di Fisher e del p*

Attraverso l'analisi dei SR (Tabella 25), possiamo vedere come tutti i gruppi si discostino molto dal loro valore atteso. In particolare, nei gruppi 4, 1 e 2 l'incidenza di Anomalie extracardiache valutate è minore rispetto al valore atteso

mentre, risulta essere maggiore nel Gruppo 3 e 5.

		AEA presenti	AEA assenti
CC 1	Contati	1	13
	Attesi	4.8	9.2
	SR	-1.7	1.3
CC 2	Contati	0	5
	Attesi	1.7	3.3
	SR	-1.3	1
CC 3	Contati	27	37
	Attesi	22	42
	SR	1.1	-0.8
CC 4	Contati	1	18
	Attesi	6.5	12.5
	SR	-2.2	1.6
CC 5	Contati	23	26
	Attesi	16.9	32.1
	SR	1.5	-1.1

Tabella 25:
descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC

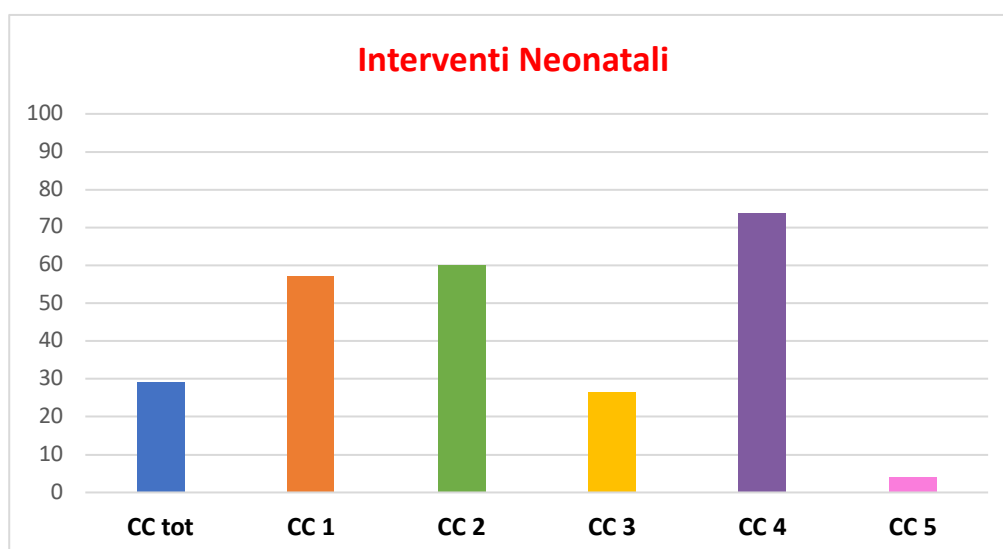
Attraverso l'analisi dei nostri risultati, possiamo concludere che: apparentemente essere affetti da CC di tipo Minor, o da CC Mayor ma, con una circolazione biventricolare (Gruppi 3 e 5), determina un rischio aggiuntivo nell'evoluzione di anomalie extracardiache. Contrariamente, le CC Mayor, con circolazione univentricolare, e il TGA, sembrerebbero essere in grado di proteggere dallo sviluppo di queste condizioni associate. Probabilmente, essendo i gruppi 1, 2 e 4 rappresentati da CC gravi, queste potrebbero determinare un meccanismo di compenso fetale maggiore di quello che potremmo avere per le CC minor (o comunque biventricolari). Il compenso emodinamico fetale, indotto dalla CC Mayor, potrebbe essere tale da permettere il corretto sviluppo dei principali organi fetali, riducendo quindi la presenza di anomalie extracardiache in questi gruppi. Questo concetto è maggiormente supportato dai dati presenti nel Gruppo 2 dove, nonostante ci aspettassimo 1.7 pazienti con anomalie associate, nessuno di questi ne era effettivamente affetto. In apparenza, sembra che le CC caratterizzate da un'ostruzione al flusso polmonare in presenza di un mono ventricolo (Gruppo 2), possano determinare la presenza di fattori protettivi per l'insorgenza di anomalie extracardiache. Concludendo, riteniamo indispensabile l'approfondimento di questi risultati con studi futuri che includano un follow up del paziente superiore a 1 mese.

3.9 Interventi neonatali e CC

Interventi Neonatali	
CC tot	29.1%
CC 1	57.1%
CC 2	60%
CC 3	26.6%
CC 4	73.7%
CC 5	4.1%

Dai risultati ottenuti attraverso l'analisi descrittiva (Tabella 26-27) si desume che solo il 29.1% delle CC generali presenta la necessità di sottoporsi ad intervento postnatale, di questi: il 73.7% fanno parte del Gruppo 4, il 60% del Gruppo 2, il 57.1% del Gruppo 1, il 26.6% del Gruppo 3 e solo il 4.1% si trova nel Gruppo 5.

Tabella 26-27: *rappresentazione dell'analisi descrittiva.*



Per quanto l'incidenza nelle CC generali sia bassa, alcuni dei gruppi hanno un'alta associazione con la variabile, in particolare: possiamo vedere come l'incidenza sia massima per il TGA (Gruppo 4) e come si mantenga alta nelle CC Mayor generali, rappresentate dai Gruppi 1 e 2, mentre risulti nettamente inferiore per le CC biventricolare, soprattutto se Minor (Gruppo 5). Possiamo quindi concludere che, per quanto concerne il semplice studio descrittivo, la maggior parte delle CC non necessita di intervento e che, la sua necessita e quindi l'incidenza, è tanto più alta quanto più è grave la CC.

Alla luce dei risultati ottenuti con l'analisi descrittiva, abbiamo deciso di continuare lo studio del rapporto fra le due variabili, con il test di Fisher (Tabella 28); I risultati ottenuti indicano una marcata dipendenza ($p=0.000$) fra le due variabili.

Interventi Neonatali	Valore	P value
Test Esatto di Fisher	42,472	0,000

Tabella 28: descrizione dell'analisi di Fisher e del p

Attraverso l'analisi degli Standardized Residual (Tabella 29), possiamo esaminare quali gruppi determinino questa distribuzione sproporzionata, a cui consegue la dipendenza statistica.

		Intervento NO	Intervento SI
CC 1	Contati	6	8
	Attesi	9.9	4.1
	SR	-1.2	1.9
CC 2	Contati	2	3
	Attesi	3.5	1.5
	SR	-0.8	1.3
CC 3	Contati	47	17
	Attesi	45.4	18.6
	SR	0.2	-0.4
CC 4	Contati	5	14
	Attesi	13.5	5.5
	SR	-2.3	3.6
CC 5	Contati	47	2
	Attesi	34.7	14.3
	SR	2.1	-3.2

Tabella 29: descrizione dell'analisi dei residui nei diversi gruppi di CC

Come si vede nella tabella, sia nel Gruppo 4 che nel 5 i valori misurati si discostano in modo netto da quelli attesi. Andando nel dettaglio, vediamo come nel Gruppo 4 vi sia una percentuale più alta di soggetti sottoposti a intervento, rispetto a quella che ci saremmo aspettati; Discorso opposto vale per il Gruppo 5, nel quale troviamo meno soggetti con la variabile, rispetto a quelli che ci saremmo aspettati.

La variabile ha quindi una forte dipendenza con il Gruppo 4, il TGA, e questo lo deduciamo sia dall'analisi descrittiva, nella quale il Gruppo 4 ha la massima incidenza, che dal test di Fischer. I risultati ottenuti, si traducono con un'indispensabile necessità che la maggior parte dei pazienti affetti da TGA ha di sottoporsi ad intervento chirurgico nell'immediato post-natale.

Perché la dipendenza è così forte per questa specifica cardiopatia?

La particolarità del TGA è che, in utero non comporta gravi alterazioni emodinamiche al feto, essendo la circolazione aortica e quella polmonare fisiologicamente comunicanti in utero; conseguentemente, il fatto che i due grossi vasi siano trasposti non sembra avere alcuna conseguenza significativa sul feto in utero.

Alla nascita la situazione cambia notevolmente, determinando il passaggio del TGA da CC asintomatica a CC Mayor. Infatti, il TGA è una cardiopatia ad elevato rischio di morte neonatale precoce che, se trattata in modo immediato, determina la possibilità di sopravvivenza con qualità di vita molto alta. Precisamente, il fatto che i vasi siano frapposti, determina alla nascita la completa separazione dei circoli polmonare e sistemico che, in questa patologia, saranno in parallelo anziché in serie [109].

Alla nascita del bambino, prima di attuare qualsiasi tipo di procedura chirurgica, sarà necessario stabilizzare l'emodinamica del neonato attraverso il ripristino, o il mantenimento, degli shunts fetali, strutture che garantiscono la sopravvivenza intrauterina. È quindi necessario mantenere pervi sia il forame ovale che dotto arterioso, così da garantire un mixing del sangue sufficiente da impedire importanti complicanze date dalla cardiopatia quali, lo scompenso cardiaco, l'ipossia e l'acidosi sistemica. Per tale motivo, la TGA rappresenta un'emergenza neonatale vera e propria, caratterizzata da un alto rischio di scompenso emodinamico subito dopo il parto, è quindi necessario far partorire la donna in un

centro di III livello, attrezzato per effettuare in urgenza una settostomia atriale con palloncino (manovra di Rashkind).

La manovra di Rashkind [110] è spesso necessaria fin dalle prime ore di vita, talvolta anche immediatamente dopo il parto, e garantisce un istantaneo miglioramento dell'ipossiemia, quindi delle condizioni metaboliche e cliniche del neonato. Senza l'intervento nell'immediato post natale, il paziente con TGA non sarebbe in grado di sopravvivere, perché la sua anatomia è incompatibile con la vita postnatale [112].

4. Conclusioni

Lo studio delle correlazioni fra le CC e le anomalie placentari è un argomento complesso e sconosciuto ai più.

Secondo i moderni studi epidemiologici e clinici, sembrerebbe esistere un'importante associazione fra le CC e la presenza di anomala morfologia placentare. Apparentemente, le anomalie della placenta sarebbero in grado di determinare un aumento del rischio di malattie cardiovascolari anche nell'adulto.

Attraverso un'analisi approfondita dello sviluppo embriologico fetale, possiamo vedere come embriogenesi del cuore e della placenta avvenga pressoché simultaneamente; è ragionevole considerare la crescita di questi due organi come un sistema strettamente interconnesso, nel quale lo sviluppo cardiaco alterato, da cui deriva la patogenesi della cardiopatia congenita, possa associarsi ad uno sviluppo placentare anch'esso anormale. Apparentemente, le evidenze provenienti dalla ricerca scientifica supportano questa ipotesi, maggiormente esplicitata dalla teoria dell'asse cuore placentare.

La teoria dell'asse cuore placentare esprime al meglio l'effetto sinergico che il cuore e la placenta possano avere fra di loro; secondo questa teoria, le anomalie cardiache e placentari possono coesistere per mezzo di anomalie, o polimorfismi, di geni comuni nello sviluppo di entrambi gli organi.

In particolare, la presenza di una mutazione in un gene coinvolto nello sviluppo sia del cuore che della placenta, potrebbe causare un effetto sinergico patogenetico per ambedue gli organi, con apparenti conseguenze maggioritarie per il cuore.

A ragion del vero, se alcuni dei percorsi comuni genetici nello sviluppo dei due organi fossero alterati, potrebbero verificarsi anomalie di sviluppo con conseguenza catastrofiche, come l'interruzione di gravidanza nel primo trimestre, evento purtroppo comune, spesso caratterizzato dalla concomitante presenza di anomalie congenite sia fetali che placentari ma, causato prevalentemente dalle lesioni fetali letali, tipicamente rappresentate dalle CC complesse [113]. Fra i geni delle vie comuni che più notoriamente sono bersaglio della mutazione causativa delle malformazioni cuore-placentare, vi sono i regolati dalla segnalazione di Wnt / β -catenina e le anomalie genetiche caratterizzate dalla mancanza di micronutrienti chiave, come il folato [114].

Purtroppo, la base meccanicistica di questa profonda relazione/interazione sinergica fra i due organi, non è ancora stata completamente chiarita e, ad oggi consideriamo l'eziologia di più del 50% delle cardiopatie come multifattoriale, nella quale la componente genetica, generalmente preponderante, interagendo con fattori ambientali, è in grado di causare la patogenesi delle CC.

Un altro punto essenziale nella patogenesi delle CC, sembrerebbe essere la salute materna, fattore che può avere un impatto significativo sia sulla salute della placenta che su quella del feto; apparentemente, l'infiammazione e lo stress ossidativo materno sembrano essere eventi frequentemente presenti a valle di una disfunzione placentare, spesso associati ad una moltitudine di altre alterazioni, come quelle dei fenomeni di trasduzione del segnale che influenzano i meccanismi di vasculogenesi, della migrazione cellulare e di una serie di altri elementi chiave per lo sviluppo fetale. Possiamo quindi descrivere il rapporto fra il cuore e la placenta come un meccanismo sinergico e molto complesso, nel quale il danno di un organo determina, come reazione a catena, un danno all'altro organo.

Uno dei più importanti eventi dannosi per entrambi gli organi, sembrerebbe essere proprio il fallimento della corretta placentazione; questa condizione può portare ad una riduzione della crescita fetale, attraverso un insufficiente apporto di nutrienti e di ormoni da parte della placenta, le cui carenze possono rendere l'ambiente fetale sfavorevole per lo sviluppo degli organi, in primis del cuore [59].

Ulteriormente importante, come meccanismo induttore delle CC, potrebbe essere l'incapacità da parte della placenta di svolgere l'importante ruolo di barriera selettiva per gli xenobiotici e per altri fattori teratogeni; l'individuazione di queste sostanze, viste come veri e propri fattori di rischio per la patogenesi delle CC, permetterebbe di agire mediante un meccanismo di prevenzione primaria, attraverso quindi l'abolizione del fattore di rischio, e di ridurre conseguentemente l'incidenza, notoriamente molto elevata, delle CC.

Considerando come molti di questi fattori teratogeni siano di origine materna, riteniamo necessario includere fattori come, il fumo, il diabete e le malattie materne, nella possibile eziopatogenesi delle anomalie placentari e delle Cardiopatie.

Infine, uno dei temi più recentemente trattati in letteratura, per quanto concerne la patogenesi sincrona delle CC e anomalie placentari, riguarda le anomalie dell'angiogenesi placentare e le sue alterazioni emodinamiche.

La presenza di un'emodinamica aberrante nella circolazione ombelicale-placentare potrebbe essere in grado di influenzare lo sviluppo patologico cardiaco; un esempio potrebbe essere osservato nel cambiamento della resistenza vascolare ombelicale, causata da eventi come vasculopatia trombotica o iperplasia delle arterie dei villi, la quale sembrerebbe riuscire ad influenzare la differenziazione dei cardiomiociti fetali, con conseguente alterazione nello sviluppo del cuore [63]. Studi recenti, si sono concentrati sull'analisi del PIGF, proteina della famiglia delle VEGF, altamente espressa dalle cellule trofoblastiche, notoriamente coinvolta nella regolazione dello sviluppo vascolare placentare. Normalmente la sua analisi viene adoperata per lo screening della Preeclampsia ma, viste le sue funzioni, si sta cercando di utilizzarla come marker per la anomala angiogenesi placentare e la possibile conseguente patogenesi delle CC. Ciò che è stato osservato in questi studi è la correlazione fra la presenza di bassi livelli di PIGF, misurati attraverso lo studio del siero materno a 11-13 settimane di gestazione e la presenza di cardiopatie del feto. Il riscontro di PIGF sierico basso, non sembrerebbe essere correlato ad anomalie di perfusione o di funzione placentare, avvalorando così l'ipotesi precedentemente esposta, secondo la quale il danno patogenetico comune ai due organi, determinerebbe conseguenze prevalentemente sul cuore [115, 69].

I bassi livelli di PIGF sembrerebbero essere associati ad un grado minore di invasione del trofoblasto delle arterie spirali, causativa di anomalie all'angiogenesi placentare, a cui può conseguire l'ipossia dell'organo stesso. L'ipossia placentare, potrebbe causare un certo grado di ipossia fetale, la quale risulta fortemente correlata allo sviluppo anormale cardiaco. Apparentemente quindi, il PIGF potrebbe essere utilizzato come marker per il rischio di patogenesi di CC, essendo associabile ad una anomalia angiogenica placentare che, mediante un meccanismo patogenetico multisteps, sembrerebbe poter esitare nello sviluppo di CC.

Un altro importante marker, utilizzato nello screening del primo trimestre, per l'aumentato rischio di CC è la translucenza nucale (TN). La TN viene definita come un accumulo di liquido nucale, visibile mediante studio ultrasonografico ed un suo aumento risulta essere un marker attendibile sia per un aumentato il rischio di CC, che per l'aumentato rischio di aneuploidie o di anomalie genetiche [116, 117]. La patogenesi alla base di una TN aumentata, sembrerebbe essere dovuta ad un aumento dell'espressione di collagene di tipo VI in sede nucale, alla quale consegue un accumulo di ialuronico altamente idrofilo [118]. Secondo altri studi, la linfangiogenesi anormale e l'insufficienza cardiaca sembrerebbero contribuire alla patogenesi dell'aumentato spessore nucale [119].

Ad oggi è noto come i feti affetti da sindrome di Down presentino un aumento di TN, indipendentemente dalla presenza e dal tipo di anomalie cardiaca [120]. È quindi ragionevole ipotizzare che l'anormale sviluppo cardiaco, essendo frequentemente associato ad un aumentato spessore dell'NT, possa essere responsabile, o correlabile, ad alterazioni al sistema nervoso centrale.

In conclusione, secondo i più recenti studi in Letteratura, l'insorgenza di CC sembra essere associata ad un deficit intrinsecamente angiogenico, presente sia nella placenta che nel cuore fetale; questi risultati sono in accordo con quelli provenienti dai modelli animali, i quali hanno costantemente dimostrato che la presenza di angiogenesi placentare alterata correlata allo sviluppo anormale cardiaco [69].

Per quanto i risultati alterati del PIGF e della TN possano portare ad un aumentato rischio di CC, la diagnosi di certezza viene eseguita esclusivamente mediante l'Ecocardiografia-ColorDoppler fetale.

Un obiettivo futuro sarà quello di facilitare la diagnosi di CC, implementando le metodologie diagnostiche, con l'uso delle tecniche di risonanza magnetica, le quali aggiungerebbero ai dati ottenuti dall'esame ecografico, la capacità di valutare maggiormente la relazione tra flusso sanguigno, la struttura e la funzione della placenta durante tutta la gravidanza. Ulteriormente importante risulta essere l'implementazione dello sviluppo di tecniche di sorveglianza, sicure e non invasive, per la caratterizzazione della placenta, già dal primo trimestre di gravidanza; questo tema è attualmente al centro di uno studio multicentrico, il Progetto Placenta umano, sponsorizzato dal NIH.

Di tutte le variabili da noi considerate, solo l'edema del cordone ha presentato una significatività statistica di dipendenza con le CC di tutti i gruppi. Il motivo che, a nostro avviso, può giustificare tale dipendenza, è da correlarsi ad una possibile alterazione della perfusione fetale che l'edema del cordone potrebbe essere in grado di causare; essendo l'edema definito come un aumento della gelatina di Warthon nel cordone, ma non essendo responsabile di un'espansione del suo volume assoluto, è probabilmente un fattore di determinazione di innalzamento della pressione intracordonale; se questo fosse vero, gli eventi che conseguirebbero ad esso, potrebbero essere responsabili di un'alterazione meccanica del flusso di sangue nel cordone, il quale potrebbe essere ostacolato dalla presenza dell'edema stesso, determinando un'alterazione alla perfusione fetale. Considerando un dogma generale della cardiologia fetale, ovvero: "nessun organo, o tessuto, può crescere adeguatamente, se non è adeguatamente perfuso" e, essendo il cuore uno dei principali e più precoci organi che si sviluppano nel feto, è alquanto logico pensare che: alterazioni della perfusione del feto, possano portare ad anomalie nello sviluppo embriologico cardiaco; questa ipotesi è avvalorata dal fatto che, la presenza dell'edema del cordone è visibile anatomopatologicamente già nelle fasi iniziali della gravidanza, non risultando una condizione esclusiva del Cordone Definitivo. Conseguentemente, la presenza di edema potrebbe avere effettivamente il tempo di influenzare lo sviluppo embriologico cardiaco.

Un ulteriore dato interessante che emerge dai nostri risultati è che, l'edema del cordone sembra essere maggiormente associato al Gruppo 4 delle CC, la TGA. Questo risultato avvalorata la nostra ipotesi, secondo la quale l'edema sarebbe responsabile di un'alterazione della perfusione fetale, alla quale conseguirebbe un

alterato sviluppo embriologico, soprattutto cardiovascolare.

Un punto molto importante del nostro studio, è il fatto che tutte le altre variabili, descrittive delle anomalie vascolari placentari (come la presenza di trombosi, ectasie, villi avascolari, etc) non hanno mostrato alcuna significatività statistica di dipendenza con le CC, andando in parte contro ad alcuni studi recenti, i quali sostenevano esserci una forte associazione angiogenica fra le anomalie vascolari placentari e le CC. Il motivo di questa mancata correlazione può essere ricercato mediante lo studio dell'anatomia microscopica dei vasi fetali e di quelli placentari e la ricerca delle loro differenze.

Sappiamo come lo sviluppo del cuore avvenga nelle fasi precoci della gravidanza e come la placenta abbia esclusivamente la funzione di sostegno, e non di induzione, dello sviluppo fetale generale. Da un punto di vista microscopico, la placenta e il feto mostrano una struttura completamente differente, anche il loro corredo cromosomico è diverso, l'unica cosa che li accomuna è l'endotelio vascolare, il quale origina per ambedue dal sacco vitellino. Ad avvalorare questo concetto, possiamo utilizzare i risultati ottenuti da due precedenti studi [64, 65] eseguiti su una delle proteine situate nella tonaca media dei vasi e coinvolta nella contrazione del muscolo liscio, la Desmina. Da questi articoli si evince che: la Desmina ha un'espressione completamente diversa nei vasi fetali rispetto a quelli del cordone, infatti mentre nei vasi fetali ha un andamento variabile nel tempo, risultando negativa nelle arterie in ogni epoca di gestazione, comparendo al secondo anno di vita e crescendo fino al quinto, e positiva nei vasi venosi già dalla 39^a settimana di gestazione, nel cordone è costantemente positiva, sia nei vasi venosi che in quelli arteriosi, in qualunque epoca di gestazione. Questo dato dimostra come il fenotipo vascolare placentare e quello fetale siano completamente diversi gli uni dagli altri, dando spiegazione del perché non sia stata individuata, nel nostro studio statistico, una marcata correlazione angiogenica fra la placenta e il cuore.

Alla luce dei nostri risultati, avendo dimostrato come l'edema del cordone possa essere un fattore di rischio per la patogenesi delle CC, riteniamo opportuno implementare lo studio ecografico fetale, durante il primo trimestre di gravidanza, con la ricerca dell'edema del cordone. Questa analisi potrà essere approfondita con la valutazione dei parametri descrittivi il flusso cordonale, studiato mediante le tecniche Doppler, nei feti presentanti l'edema del cordone precocemente; in

questo modo, si potrà confermare la presenza di un'alterata perfusione fetale indotta dall'edema stesso.

Avendo preso coscienza dei risultati ottenuti da recenti studi, ci impegnammo inoltre ad implementare il nostro studio con la ricerca del PIGF materno, così da poter completare lo studio dell'analisi angiogenica come fattore comune patogenetico fra la placenta e le CC.

Un altro importante argomento di studio in letteratura fa riferimento all'associazione fra l'anomalo inserimento del cordone e le CC. I meccanismi che determinano l'inserimento anormale del cordone ombelicale non sono ancora del tutto noti ma, molto probabilmente questi eventi sono operativi già dal primo trimestre. Secondo la teoria del trofotropismo: il corion frondosum placentare "migra" con l'avanzare della gestazione per assicurare un migliore afflusso di sangue al feto [73] ma, poiché il cordone ombelicale non è in grado di seguire la migrazione della placenta, potrebbe rimanere in una posizione "anomala", periferica o marginale, all'inizio della gravidanza, in grado di evolversi addirittura in inserimento velamentoso con l'avanzare della gestazione. Se questa teoria fosse vera, la prevalenza dell'inserzione anomala del cordone ombelicale dovrebbe essere inferiore nel primo trimestre, rispetto al secondo o al parto. In realtà quell'ipotesi non è stata confermata da studi successivi, non essendo stato osservato alcun caso di inserimento normale cordonale nel primo trimestre, evoluto in velamentoso con l'avanzamento della gravidanza. Questo risultato è in linea con l'evidenza che la migrazione placentare non è poi un evento così comune come era stato inizialmente pensato [120].

Tralasciando l'effettivo meccanismo patogenetico dell'anomalo inserimento cordonale, alcuni recenti studi giustificano la necessità di eseguire uno screening ecografico prenatale, a 11-14 settimane, per la valutazione dell'inserimento cordonale, perché ritengono la presenza di questo come un fattore di rischio per le CC [121]. Contrariamente a quanto sostenuto dalla letteratura, i nostri risultati indicano che l'inserimento anormale del cordone sulla placenta non è associato ad un aumento del tasso di CC, infatti, da i nostri risultati non si evince alcuna dipendenza statistica fra le due variabili; conseguentemente, riteniamo superfluo implementare lo studio ecografico di screening con la sua valutazione.

Osservando i principali temi trattati dalla letteratura, nell'ambito sempre delle correlazioni fra il cuore e la placentare, abbiamo voluto analizzare alcuni parametri nel nostro campione in studio, la cui correlazione statistica è ben nota in letteratura; fra questi, ci siamo concentrati sullo studio dell'associazione fra il peso della placenta, l'IUGR e Arteria ombelicale singola, e le CC, con lo scopo di confermare i risultati ottenuti dalla Letteratura.

Sulla base delle precedenti osservazioni, il basso peso placentare, misurato alla nascita, risulta essere direttamente correlato alle CC ma, contrariamente a quanto detto, nel nostro campione non è stata riscontrata alcuna associazione fra le variabili "peso placentare e CC". Questo risultato si discosta dalla maggior parte della letteratura ma, ci permette di concordare con uno studio in particolare [71], nel non ritenere il peso della placenta alla nascita un fattore predittivo di CC.

Similmente al discorso del peso placentare, i nostri risultati, riferiti all'associazione fra l'IUGR e le CC, contraddicono quella che è l'opinione comune in Letteratura, ovvero che esista un'associazione fra la restrizione di crescita e le Cardiopatie; I nostri risultati infatti, non hanno mostrato alcuna associazione statistica fra le due variabili, nonostante ci risulti un'incidenza, nella popolazione di cardiopatici, nettamente superiore a quella della popolazione generale, non vi è alcuna dipendenza statistica fra le IUGR e le CC, soprattutto se Mayor.

Per quando riguarda lo studio della AOS in relazione alle CC, i nostri risultati ci permettono di concordare con la letteratura nel considerare non necessario lo studio ecocardiografico in madri che presentano come unica anomalia la presenza dell'AOS, non avendo riscontrato nei nostri risultati, alcuna dipendenza statistica fra la variabile e le CC; conseguentemente, non riteniamo necessario considerare la presenza della AOS come un fattore causativo indipendente delle CC.

Per poter completare il nostro studio, abbiamo ritenuto necessaria la valutazione delle variabili esclusive del feto e del neonato, relazionate alle CC. L'importanza di questa analisi risiede nel fatto che, lo studio del comportamento di questi dati all'interno di specifici gruppi di CC, sia un argomento poco trattato in Letteratura. Una delle prime variabili su cui ci siamo concentrati è il genere del bambino. Dai risultati del nostro studio si evince che la maggior parte delle cardiopatie si sviluppa nei pazienti di sesso maschile, più precisamente, il sesso maschile sembra essere associato a CC Mayor, con un unico ventricolo, e alla dTGA, mentre le femmine sono prevalentemente affette da CC Minor, o comunque con due ventri-

colari. Le ragioni che potrebbero spiegare questi risultati sono: o il sesso femminile presenta fattori protettivi per la patogenesi delle CC Mayor, oppure è il sesso maschile a determinare un fattore di rischio per lo sviluppo di queste CC. Sicuramente, riteniamo necessario implementare questa singola analisi attraverso lo studio dei cromosomi sessuali, dalla cui mappatura potremmo sperare nell'identificazione di geni correlati alla patogenesi delle CC. Qualora questa ricerca si mostrasse infruttuosa, cercheremo di spiegare il fenomeno da noi riportato, attraverso lo studio dello sviluppo, e della degenerazione fisiologica, dei dotti di Wolff e Muller, nella speranza di ritrovare in questi la spiegazione dei nostri risultati.

Un'interessante punto del nostro studio, riguarda l'analisi delle AA extracardiache associate alle CC. Abbiamo preferito considerare le anomalie come un'unica variabile, con lo scopo di valutarne la sua distribuzione nei diversi gruppi di CC, e non la loro semplice incidenza; quello che si evince dai nostri risultati è che: le CC Mayor, mono ventricolari e TGA, si mostrano con una bassa incidenza e una scarsa associazione di AA extracardiache; discorso opposto può essere fatto per le CC minor, le quali invece si presentano fortemente associate alle AA extracardiache. Il razionale che potrebbe esserci dietro a questo risultato, potrebbe essere così spiegato: le CC Mayor, essendo responsabili di difetti anatomici gravi, potrebbero essere in grado di indurre un compenso emodinamico fetale, materno e/o placentare, così da sovrastare la possibile, o inevitabile, crisi emodinamica che queste CC sarebbero in grado di causare. Secondo questo ragionamento, potrebbe essere proprio questo compenso sistemico, indotto appunto dall'anomalia cardiaca grave, a favorire il corretto sviluppo degli altri organi, ostacolando così la patogenesi delle anomalie extracardiache. Contrariamente, le CC minor, non causando un grave danno anatomico, potrebbero non necessitare di un compenso emodinamico tale da permettere l'instaurazione di meccanismi che tutelano lo sviluppo degli altri organi.

Come ultima analisi, abbiamo voluto valutare la necessità che ha il bambino cardiopatico di sottoporsi ad un intervento chirurgico, o una cateterizzazione, ricercando come questa variabile si distribuisce nelle varie cardiopatie e, conseguentemente, definendo quali sono le CC che presentano il rischio di scompenso maggiore nell'immediato post-natale. Grazie ai nostri risultati, possiamo concordare con gli studi anatomofisiopatologici e emodinamici delle CC, in quando ci risulta

che sia il TGA, Gruppo 4, ad essere più frequentemente correlato alla necessità di intervento postnatale. Ovviamente questo risultato non ci sorprende, considerando come il TGA venga ritenuta una CC silente ed emodinamicamente stabile nel feto, grazie alla presenza degli shunt fisiologici che mettono in comunicazione la circolazione sistemica e quella polmonare nel feto, mentre può essere una vera e propria emergenza chirurgica nel neonato, contraddistinta da un alto rischio di scompenso emodinamico. Tutte le altre CC non hanno mostrato una forte dipendenza dall'IC in quanto, sia i pazienti con le Mayor che quelli con le Minor, è noto che possano sopravvivere senza necessità di IC d'urgenza.

Il nostro studio risulta limitato da alcuni fattori: innanzitutto, la natura retrospettiva e l'assenza di un gruppo di controllo, limitano in parte le nostre conclusioni, non permettendoci di escludere la presenza dell'evento, da noi dimostrato essere correlato statisticamente con le CC, all'interno della popolazione generale.

Sicuramente, la presenza di un confronto diretto con una popolazione normale, analizzata nel medesimo modo e simultaneamente ai gruppi di feti affetti da CC, ci permetterebbe effettivamente di dimostrare se i nostri risultati siano applicabili alla popolazione globale o se, come sospettiamo, siano eventi esclusivi della popolazione di cardiopatici.

Inoltre, alcune delle variabili da noi considerate, se avessimo a disposizione un gruppo di controllo, potrebbero presentarsi, non solo non associate a CC ma, con un andamento pressoché uguale nella popolazione generale. Un esempio potrebbe riguardare il peso placentare, il quale potrebbe risultare anomalo a causa di molteplici fattori, ma non essere responsabile dell'induzione di eventi patologici nel feto; inoltre, non esiste un metodo sistematico per poter drenare il sangue dalla placenta, previa misurazione, quindi la valutazione del peso della placenta dipende in larga misura dalle diverse metodologie di analisi dei vari ospedali.

Concludendo, se fossimo in grado di vedere morfologie e pesi della placenta, ritenuti anomali, anche nella popolazione sana, limiteremmo ulteriormente le conclusioni attuate dalla letteratura, nel considerare le alterazioni del peso placentare un fattore induttivo patologico per il feto.

La necessità di un gruppo di controllo si esplica ancor meglio nella valutazione dell'AIC infatti, qualora dovesse essere visto con un'incidenza simile anche nella popolazione sana, si potrebbe pensare di considerarlo, non solo non associato a CC ma, una variante fisiologica. Questo ragionamento si applica bene alla modali-

tà Eccentrica, essendo la più numerosa nel nostro campione, e non avendo riscontrato in questo alcuna dipendenza statistica con le CC, è probabile che, se dovessimo ritrovarlo altrettanto di frequente nella popolazione sana, possa essere ritenuto una semplice variante anatomica. Ci asteniamo dal ritenere vero un discorso analogo per quanto riguarda la modalità Velementosa; purtroppo il numero di pazienti con questa anomalia all'interno del nostro campione, è molto esiguo (15 pazienti totali) e, essendo lo studio della correlazione fra questa anomalia e le CC uno dei temi maggiormente sostenuti dalla letteratura, riteniamo necessario implementare il nostro gruppo di analisi con un maggior numero di pazienti con questa condizione, così da poter migliorare la qualità della nostra analisi statistica.

Uno dei limiti più importanti nel nostro studio risulta essere la mancanza di alcuni dati. Questo limite è prevalentemente secondario all'impossibilità di ottenere la maggior parte dei dati materni relativi all'anamnesi patologica ostetrica e allo screening del I trimestre di gravidanza, perché effettuato, molto spesso, al di fuori del nostro Istituto. La mancanza di questi dati ha ostacolato il raggiungimento di alcuni obiettivi che ci eravamo prefissati, come l'analisi della comparazione fra le anomalie placentari, le CC e la Preeclampsia. Considerando l'importanza che questo tipo di correlazioni possano avere in molteplici ambiti clinici, come la prevenzione primaria delle CC nella donna in gravidanza, è nostra volontà futura andare a reperire i dati mancanti presso i database dei diversi centri, italiani e non, così da ottenere un campione il più completo possibile ed eseguire un'analisi delle correlazioni fra le CC e i suoi possibili induttori, che comprenda anche i fattori di rischio indotti dalla madre. Purtroppo questo completamento di dati, porterà ad inficiare in parte uno dei punti saldi del nostro studio infatti, andremo a perdere un po' di uniformità dell'analisi di campionamento e di diagnosi che contraddistingue i dati utilizzati per questo studio.

In conclusione, riteniamo necessario implementare il nostro database con i dettagli dei fattori materni che potrebbero influenzare la salute della placenta e del feto, focalizzandoci soprattutto sul fumo, sul diabete e sulle malattie materne, su i farmaci e sugli eventi patologici riferiti alle gravidanze precedenti, come preeclampsia e il diabete gestazionale.

Per poter far chiarezza sulla anormale angiogenesi placentare come un meccanismo di patogenesi comune alle anomalie vascolari della placenta, alle CC e a patologie materne gravidanza correlate, riteniamo necessario implementare il

nostro studio con la ricerca le PIGF, nel siero materno a 11-13 settimane di gestazione; la ricerca di questo parametro è eseguita come test di routine per lo screening della Preeclampsia [115, 69], essendo questa condizione patologica ritenuta fortemente associata ad anomalie della placenta dalla letteratura, crediamo sia necessario ricercare la sua correlazione con le CC. Sfruttando i risultati ottenuti da studi precedenti, secondo i quali, nei casi di Preeclampsia, il PIGF basso è accompagnato anche da un basso PAPP-A e un alto UtA-PI, consideriamo fondamentale incorporare nel nostro studio i parametri di screening nella gravidanza, come il B-test e i risultati ecografici e del eco-Doppler dei diversi trimestri di gravidanza, in quanto, se questi si presentassero associati a CC, potremmo utilizzarli per ottimizzare il controllo di questi pazienti, avviandoli ad una indagine ecocardiografica specifica, aumentando così il numero di diagnosi precoci, migliorando la prognosi e permettendoci di incrementare la prevenzione, primaria e secondaria, nelle madri contraddistinte dalla presenza di questi parametri alterati.

Facendo fede agli articoli recenti, riteniamo necessario implementare il follow-up dei pazienti, soprattutto incentrandolo all'analisi dello sviluppo neurologico, eventualmente attraverso l'esecuzione di RM encefalica nel bambino e la valutazione della pulsatilità dell'arteria cerebrale media nel feto, così da poter studiare se e come le CC possano effettivamente interferire con lo sviluppo cerebrale.

In ultima analisi, riteniamo necessario implementare i nostri lavori futuri con lo studio dell'analisi genetica, sia specifica per i geni noti dello sviluppo embriologico cardiaco e dei cromosomi sessuali, nella speranza di dare una spiegazione fisiopatogenetica ai risultati da noi ottenuti in merito al genere sessuale, sia incentrata sulla correlazione fra le CC e le sindromi cromosomiche, argomento che abbiamo potuto analizzare solo superficialmente in questo studio, a causa di una scarsità del campione, infatti solo 17 pazienti in esame presentavano sindromi cromosomiche, conseguentemente, riteniamo necessario inserire nel nostro studio futuro, un maggior numero di pazienti sindromici, così da poter verificare se e come si comporti questa variabile nei riguardi delle singole cardiopatie.

5. Bibliografia

1. Liu Y, Sen C, Liesl Z, et al.«Global Birth Prevalence of Congenital Heart Defects 1970-2017: Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 260 Studies». *International Journal of Epidemiology*
- 2.Gurvitz M, Burns K, Brindis R, et al. «Emerging Research Directions in Adult Congenital Heart Disease: A Report from a National Heart, Lung, and Blood Institute/Adult Congenital Heart Association Working Group». *Journal of the American College of Cardiology* 67, n. 16
3. Denise van der L, Konings E.M, Slager A.M, et al. «Birth Prevalence of Congenital Heart Disease Worldwide: A Systematic Review and Meta-Analysis». *Journal of the American College of Cardiology* 58, n. 21
- 4.Cook R, Alday L, Eriksen K, et al. «Patient-Reported Outcomes in Adults with Congenital Heart Disease: Inter-Country Variation, Standard of Living and Healthcare System Factors». *International Journal of Cardiology* 251
- 5.Torres-Cosme J.L, Rolón-Porras C, Aguinaga-Ríos M,et al. «Mortality from Congenital Heart Disease in Mexico: A Problem on the Rise». *PLoS ONE* 11, n. 3
6. Guorong L, Shaohui L, Peng J, et al. «Cerebrovascular Blood Flow Dynamic Changes in Fetuses with Congenital Heart Disease». *Fetal Diagnosis and Therapy* 25, n. 1
7. Kaltman J.R, Tian Z, Rychik J et al. «Impact of Congenital Heart Disease on Cerebrovascular Blood Flow Dynamics in the Fetus». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 25, n. 1
8. Marino B.S., Lipkin P.H., Newburger J.et al«Neurodevelopmental Outcomes in Children with Congenital Heart Disease: Evaluation and Management». *Circulation* 126, n. 9
9. Zaidi S, Brueckner M, et al. «Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease». *Circulation research* 120, n. 6
- 10.Huang J.B, Ying-Long L, Xiao-Dong L «Pathogenic Mechanisms of Congenital Heart Disease». *Fetal and Pediatric Pathology* 29, n. 5
11. Versacci P, Di Carlo D, DigilioM. C, et al. «Cardiovascular Disease in Down Syndrome. »*Current Opinion in Pediatrics* 30, n. 5
- 12.Rosa R.F, Machado R, Mombach P, et al. «Clinical Characteristics of a Sample of

- Patients with Cat Eye Syndrome». *Revista Da Associacao Medica Brasileira* (1992) 56, n. 4
13. Hureaux M., Guterman S., Hervé B, et al. «Chromosomal Microarray Analysis in Fetuses with an Isolated Congenital Heart Defect: A Retrospective, Nationwide, Multicenter Study in France». *Prenatal Diagnosis*
 14. Pierpont M.E, Digilio M.C «Cardiovascular Disease in Noonan Syndrome». *Current Opinion in Pediatrics* 30, n. 5
 15. Zhao L, Lizhang C, Tubao Y, et al. «Parental Smoking and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: An Updated Meta-Analysis of Observational Studies». *European Journal of Preventive Cardiology*
 16. Brite J., Laughon S.K, Troendle J et al. «Maternal Overweight and Obesity and Risk of Congenital Heart Defects in Offspring». *International Journal of Obesity* (2005) 38, n. 6
 17. Mitchell M.E, Sander T.L, Klinkner D.B, et al. «The Molecular Basis of Congenital Heart Disease». *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 19, n. 3
 18. Rose V, Clark E «Etiology of Congenital Heart Disease». In *Neonatal Heart Disease*, 3–17. London: Springer London
 19. Daisuke K, Salaam S, Humes R.A. «Tetralogy of Fallot with Complete DiGeorge Syndrome: Report of a Case and a Review of the Literature». *Congenital Heart Disease* 8, n. 4
 20. Digilio M.C, Silvestri L.M, Dallapiccola B, et al. «Le basi genetiche delle cardiopatie congenite», s.d., 14.
 21. Mourato F.A, Villachan L.R, da Silva Mattos S «Prevalence and profile of congenital heart disease and pulmonary hypertension in Down syndrome in a pediatric cardiology service». *Revista Paulista de Pediatria* 32, n. 2
 22. Campione F.D, Kelly R, Zammit P.S et al. «Multiple Transcriptional Domains, with Distinct Left and Right Components, in the Atrial Chambers of the Developing Heart». *Circulation Research* 87, n.11
 23. Rychik J, Donna Goff E, McKay A, et al. «Characterization of the Placenta in the Newborn with Congenital Heart Disease: Distinctions Based on Type of Cardiac Malformation». *Pediatric Cardiology* 39, n. 6
 24. Dockery P., Bermingham J, Jenkins D. «Structure-Function Relations in the Human Placenta». *Biochemical Society Transactions* 28, n. 2

25. Hafez S. «Comparative Placental Anatomy: Divergent Structures Serving a Common Purpose». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 145
26. Gude N, Claire M, Roberts T, et al. «Growth and Function of the Normal Human Placenta». *Thrombosis Research* 114, n. 5–6
27. Ente G, Penzer P.H. «The Umbilical Cord: Normal Parameters». *Journal of the Royal Society of Health* 111, n. 4
28. Richardson L, Vargas G, Brown Tet al. «Redefining 3Dimensional Placental Membrane Microarchitecture Using Multiphoton Microscopy and Optical Clearing». *Placenta* 53
29. King B.F, Blankenship T.N «Differentiation of the Chorionic Plate of the Placenta: Cellular and Extracellular Matrix Changes during Development in the Macaque». *The Anatomical Record* 240, n. 2
30. Zaccheo D, Pestarino M, Fulcheri E «Anatomia Microscopica». Editore: A. Portalupi. 2013 Pearson Italia, Milano-Torino.
31. Mabelle L, Mauroy B, Merryn H et al. «A Multiscale Model of Placental Oxygen Exchange: The Effect of Villous Tree Structure on Exchange Efficiency». *Journal of Theoretical Biology* 408
32. Enders A.C, «Anatomy of the Placenta and Its Relationship to Function». *Mead Johnson Symposium on Perinatal and Developmental Medicine*, n. 18
33. Burton, Graham J., Fowden. A «The Placenta: A Multifaceted, Transient Organ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370, n. 1663
34. Goplerud J.M, Delivoria-Papadopoulos M «Physiology of the Placenta--Gas Exchange». *Annals of Clinical and Laboratory Science* 15, n. 4
35. Fuchs R, Ellinger I «Endocytic and Transcytotic Processes in Villous Syncytiotrophoblast: Role in Nutrient Transport to the Human Fetus». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5, n. 10
36. Redline R.W «The Structural Basis of Maternal-Fetal Immune Interactions in the Human Placenta». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 222
37. Bauer M.K, Harding J.E, Bassett N, et al. «Fetal Growth and Placental Function». *Molecular and Cellular Endocrinology* 140, n. 1–2
38. Cane F «THE FUNCTIONS OF THE AMNION. » *The Lancet* 132, n. 3409
39. Boo H.A, Harding. J.E «The Developmental Origins of Adult Disease (Barker) Hypothesis». *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics*

&Gynaecology 46, n. 1

40. Guttmacher A.E, Maddox Y.T, Spong C «The Human Placenta Project: Placental Structure, Development, and Function in Real Time». *Placenta* 35, n. 5
41. Khong T.Y, Mooney E.E, Ariel I, et al. «Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 140, n. 7
42. Øyen N, Olsen S.F, Basit S, et al. «Association Between Maternal Folic Acid Supplementation and Congenital Heart Defects in Offspring in Birth Cohorts from Denmark and Norway». *Journal of the American Heart Association* 8, n. 6
43. Linask K.K «The Heart-Placenta Axis in the First Month of Pregnancy: Induction and Prevention of Cardiovascular Birth Defects». *Journal of Pregnancy*
44. Schneider H, Luckhardt M «Development of the placenta and utero-placental circulation from the morphologic and functional viewpoint». *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde* 49, n. 10
45. Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health «Langman's medical embryology. - NLM Catalog - NCBI». – 13th Edition
46. Human Embryology «Development of the umbilical cord».
47. Benirschke K, Miller C.J «Anatomical and Functional Differences in the Placenta of Primates». *Biology of Reproduction* 26, n. 1
48. Männer J «The Anatomy of Cardiac Looping: A Step towards the Understanding of the Morphogenesis of Several Forms of Congenital Cardiac Malformations». *Clinical Anatomy* 22, n. 1
49. Dalgleish A. E. «The Development of the Septum Primum Relative to Atrial Septation in the Mouse Heart». *Journal of Morphology* 149, n. 3
50. Webb S., Brown N.A, Anderson R.H «Formation of the Atrioventricular Septal Structures in the Normal Mouse». *Circulation Research* 82, n. 6
51. Lamers W.H, Moorman A. «Cardiac Septation: A Late Contribution of the Embryonic Primary Myocardium to Heart Morphogenesis». *Circulation Research* 91, n. 2
52. Laane H. M. «The Septation of the Arterial Pole of the Heart in the Chick Embryo. III. Development of the Truncus Arteriosus of the Heart of Chick Embryos from 5 1/2 to 7 Days of Incubation». *Acta Morphologica Neerlandica-Scandinavica* 17, n. 1

53. Yagel S, Silverman N.H, Gembruch U; associate editor, Sarah Margalyt Cohen. – 2nd ed. «Fetal cardiology: embryology, genetics, physiology, echocardiographic evaluation, diagnosis, and perinatal management of cardiac diseases »
54. Degner K, Magness R, Dinesh M.S. «Establishment of the Human Uteroplacental Circulation: A Historical Perspective». *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 24, n. 5
55. Genbacev O, Schubach S.A, Miller R.K«Villous Culture of First Trimester Human Placenta--Model to Study Extravillous Trophoblast (EVT) Differentiation». *Placenta* 13, n. 5
56. Adamson S, Lee Y.L, Whiteley K.J, et al.«Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta». *Developmental Biology* 250, n. 2
57. Thornburg K.L, Louey S «Uteroplacental Circulation and Fetal Vascular Function and Development». *Current Vascular Pharmacology* 11, n. 5
58. Cross J.C, Hemberger M, Lu Y, et al. «Trophoblast Functions, Angiogenesis and Remodeling of the Maternal Vasculature in the Placenta». *Molecular and Cellular Endocrinology* 187, n. 1–2
59. Burton G.J, Fowden A.L, Thornburg K.L «Placental Origins of Chronic Disease». *Physiological Reviews* 96, n. 4
60. Endler M, Saltvedt S, Cnattingius S, et al. «Retained Placenta Is Associated with Pre-Eclampsia, Stillbirth, Giving Birth to a Small-for-Gestational-Age Infant, and Spontaneous Preterm Birth: A National Register-Based Study». *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 121, n. 12
61. Kiserud T, Acharya G. «The Fetal Circulation». *Prenatal Diagnosis* 24, n. 13
62. Hooper S.B, Arjan B, Lang J, et al. «Cardiovascular Transition at Birth: A Physiological Sequence». *Pediatric Research* 77, n. 5
63. Burton G.J, Jauniaux E «Development of the Human Placenta and Fetal Heart: Synergic or Independent? »*Frontiers in Physiology*9
64. B. Gualco “Espressione dei markers fenotipici caratterizzanti la parete dei vasi venosi nel feto e nel neonato”
65. Camoirano “Caratterizzazione immunofenotipica delle costituenti di parete nei grandi vasi arteriosi fetali”
65. Matthiesen N.B, Henriksen T.B, Agergaard P, et al.«Congenital Heart Defects and Indices of Placental and Fetal Growth in a Nationwide Study of 924 422 Liveborn

- Infants». *Circulation* 134, n. 20
66. Ruiz A., Cruz-Lemini M, Masoller N, et al. «Longitudinal Changes in Fetal Biometry and Cerebroplacental Hemodynamics in Fetuses with Congenital Heart Disease». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 49, n. 3
 67. Ruiz A, Ferrer Q, Sánchez O, et al. «Placenta-related complications in women carrying a foetus with congenital heart disease». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 29, n. 20
 68. Llurba E, Sánchez O, Ferrer Q, et al. «Maternal and Foetal Angiogenic Imbalance in Congenital Heart Defects». *European Heart Journal* 35, n. 11
 69. Llurba E., Syngelaki A, Sánchez O, et al. «Maternal Serum Placental Growth Factor at 11-13 Weeks' Gestation and Fetal Cardiac Defects». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 42, n. 2
 70. Brodwall K, Leirgul E, Greve G, et al. «Possible Common Aetiology behind Maternal Preeclampsia and Congenital Heart Defects in the Child: A Cardiovascular Diseases in Norway Project Study». *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 30, n. 1
 71. Albalawi A, Brancusi F, Askin F, et al. «Placental Characteristics of Fetuses with Congenital Heart Disease». *Journal of Ultrasound in Medicine* 36, n. 5
 72. Miyoshi T, Isao S, Shinji K, et al. «Fetal congenital heart defects and abnormality of placenta and umbilical cord». *Placenta* 34
 73. Monie I. W. «Velamentous insertion of the cord in early pregnancy». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 93, n. 2
 74. Maslen C.L «Recent Advances in Placenta–Heart Interactions». *Frontiers in Physiology* 9
 75. Botting C, Sferruzzi-Perri: “Near to one’s Heart: The Intimated Relationship Between the Placenta and the Fetal Heart”
 76. Tuo G, Marasini M. Capitolo 1 incluso nel libro “Cardiologia Pediatrica. Problematriche cliniche”. Marino B, Milanesi O, Formigari R, Santoro G.I Edizione (2015), Edizione Minerva Medica.
 77. Rychik J, Ayres N, Cuneo B, et al. «American Society of Echocardiography Guidelines and Standards for Performance of the Fetal Echocardiogram». *Journal of the American Society of Echocardiography* 17, n. 7

78. Wapner R.J, Martin C.L, Levy B, et al. «Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis». *The New England Journal of Medicine* 367, n. 23
79. Saldarriaga W, Herney A, Perdomo G, et al. «Karyotype versus Genomic Hybridization for the Prenatal Diagnosis of Chromosomal Abnormalities: A Metaanalysis». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 212, n. 3
80. Bornstein E, Berger S, Cheung S.W, et al. «Universal Prenatal Chromosomal Microarray Analysis: Additive Value and Clinical Dilemmas in Fetuses with a Normal Karyotype». *American Journal of Perinatology* 34, n. 4
81. Deng Q, Fu F, Li R, et al. «Application of chromosomal microarray analysis for fetuses with ventricular septal defects». *Zhonghua Yi Xue Yi ChuanXueZaZhi = ZhonghuaYixueYichuanxueZazhi = Chinese Journal of Medical Genetics* 34, n. 5
82. Seki M, Strauss L «Absence of One Umbilical Artery. Analysis of 60 Cases with Emphasis on Associated Developmental Aberrations». *Archives of Pathology* 78 (ottobre 1964): 446–53.
83. Vitse M, Silberberg L, Dufermont H. «A case of solitary umbilical artery». *Bulletin De La FederationDesSocietes De Gynecologie Et Dobstetrique De Langue Francaise* 18, n. 5 (dicembre 1966): 469–70.
84. Prefumo F., Güven M.A, Carvalho J.S. «Single Umbilical Artery and Congenital Heart Disease in Selected and Unselected Populations». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 35, n. 5
85. Wallenstein M.B, Harper L.M, Odibo A.O, et al. «Fetal Congenital Heart Disease and Intrauterine Growth Restriction: A Retrospective Cohort Study». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 25, n. 6
86. Lenoski E.F, Medovy H «Single Umbilical Artery: Incidence, Clinical Significance and Relation to Autosomal Trisomy». *Canadian Medical Association Journal* 87
87. Volpe G, Volpe P, Boscia F.M, et al. «Isolated single umbilical artery: incidence, cytogenetic abnormalities, malformation and perinatal outcome». *Minerva Ginecologica* 57, n. 2
88. Hua M, Odibo A.O, Macones G.A, et al. «Single Umbilical Artery and Its Associated Findings». *Obstetrics and Gynecology* 115, n. 5

89. Gurram P, Figueroa R, Sipusic E, et al. «Isolated Single Umbilical Artery and Fetal Echocardiography: A 25-Year Experience at a Tertiary Care City Hospital». *Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 37, n. 2
90. Wallenstein M.B, Harper L.M, Odibo A.O, et al. «Fetal Congenital Heart Disease and Intrauterine Growth Restriction: A Retrospective Cohort Study». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 25, n. 6
91. Persson M, Razaz N, Edstedt B.A, Villamor E, Cnattingius S.«Maternal Obesity and Congenital Heart Defects». American College of Cardiology.
92. Šamánek M. «Boy:Girl Ratio in Children Born with Different Forms of Cardiac Malformation: A Population-Based Study». *Pediatric Cardiology* 15, n. 2
93. Copel J.A, Pilu G, Kleinman C.S«Congenital heart disease and extracardiac anomalies: Associations and indications for fetal echocardiography». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 154, n. 5
94. Stoll C, Dott B, Alembik Y, et al.«Associated Noncardiac Congenital Anomalies among Cases with Congenital Heart Defects». *European Journal of Medical Genetics* 58, n. 2
95. Koçak G, Onal C, Koçak A, et al.«Prevalence and Outcome of Congenital Heart Disease in Patients with Neural Tube Defect». *Journal of Child Neurology* 23, n. 5
96. Holzer R, Franklin R. «Congenital heart disease and neuroblastoma: just coincidence? »*Archives of Disease in Childhood* 87, n. 1
97. Shafi T, Khan M.R, Atiq M. «Congenital Heart Disease and Associated Malformations in Children with Cleft Lip and Palate in Pakistan». *British Journal of Plastic Surgery* 56, n. 2
98. Diaz L.K, Akpek E.A, Dinavahi R, et al. «Tracheoesophageal Fistula and Associated Congenital Heart Disease: Implications for Anesthetic Management and Survival». *Paediatric Anaesthesia* 15, n. 10
99. Boatman D.L, Kölln C.P, Flocks R.H. «Congenital Anomalies Associated with Horseshoe Kidney». *The Journal of Urology*

100. Schievink W.I, Mokri B, Piepgras D.G, et al.«Intracranial Aneurysms and Cervicocephalic Arterial Dissections Associated with Congenital Heart Disease». *Neurosurgery* 39, n.
101. Pascall E, Tulloh R. «Pulmonary hypertension in congenital heart disease». *Future Cardiology* 14, n. 4
102. Grech V, Gatt M. «Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study». *International Journal of Cardiology* 68, n. 2
103. MarwaM.A, Assiut University «Hypothyroidism With Congenital Heart Disease (CHD) - Full Text View - ClinicalTrials.Gov».
104. Sepulveda W, Rojas I, Robert J.A, et al.«Prenatal Detection of Velamentous Insertion of the Umbilical Cord: A Prospective Color Doppler Ultrasound Study». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 21, n. 6
105. Wang J, Ye Y, Xin T, et al.«Is Echocardiography Necessary for All Single Umbilical Artery Fetuses? A Retrospective Study in a Selected Chinese Population». *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 0, n. 0
106. Chen K, Akoma U, Anderson A, et al.«Prenatally Diagnosed Single Umbilical Artery: The Role and Relationship of Additional Risk Factors in the Fetus for Congenital Heart Disease». *Journal of Clinical Ultrasound: JCU* 44, n. 2
107. Romo A, Carceller R, Tobajas J. «Intrauterine Growth Retardation (IUGR): Epidemiology and Etiology». *Pediatric Endocrinology Reviews: PER* 6 Suppl 3
108. Merriman J, Elovitz M, Sober S, et al.«498: Congenital Heart Defects and IUGR: Fact or Fiction? Does the Type of CHD Matter?» *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 197, n. 6
109. Konuma T, Shimpo H. «Transposition of Great Artery». *KyobuGeka. The Japanese Journal of Thoracic Surgery* 68, n. 8
110. Mukherjee D, Lindsay M, Zhang Y, et al.«Analysis of 8681 Neonates with Transposition of the Great Arteries: Outcomes with and without Rashkind Balloon Atrial Septostomy». *Cardiology in the Young* 20, n. 4
111. Uricchio N, Ghiselli S, Marianeschi S.M. «Transposition of the great arteries». *Giornale Italiano Di Cardiologia (2006)* 16, n. 2

112. Schidlow D.N, Jenkins K.J, Gauvreau K, et al.«Transposition of the Great Arteries in the Developing World: Surgery and Outcomes». *Journal of the American College of Cardiology* 69, n. 1
113. Huhta J, Linask K.K «Environmental Origins of Congenital Heart Disease: The Heart-Placenta Connection». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 18, n. 5
114. Maslen C.L «Recent Advances in Placenta–Heart Interactions». *Frontiers in Physiology* 9
115. Tsiakkas A, Duvdevani N, Wright A, et al. «Serum Placental Growth Factor in the Three Trimesters of Pregnancy: Effects of Maternal Characteristics and Medical History». *Ultrasound ObstetGynecol*
116. Hyett J, Perdu M, Sharland G, et al.«Using fetal nuchal translucency to screen for major congenital cardiac defects at 10-14 weeks of gestation: population based cohort study». *BMJ: British Medical Journal* 318, n. 7176
117. Ali M.M, Chasen S.T, Norton M.T. «Testing for Noonan Syndrome after Increased Nuchal Translucency». *Prenatal Diagnosis* 37, n. 8
118. Haak M.C, Van Vugt J.M «Pathophysiology of increased nuchal translucency: a review of the literature. »*Human reproduction update* 9, n. 2
119. Haak M.C, Bartelings M.M, Jackson D.G «Increased nuchal translucency is associated with jugular lymphatic distension» - PubMed - NCBI.
120. Clur S, Oude Rengerink J,Ottenkamp J, et al.«Cardiac Function in Trisomy 21 Fetuses». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 37, n. 2
121. Oppenheimer L, Holmes P,Simpson N, et al. «Diagnosis of Low-Lying Placenta: Can Migration in the Third Trimester Predict Outcome? Placental Migration». *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 18, n. 2
122. Hasegawa J, Matsuoka R, Ichizuka K,et al.«Cord Insertion into the Lower Third of the Uterus in the First Trimester Is Associated with Placental and Umbilical Cord Abnormalities». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 28, n. 2